

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



EFFECTO DE MELATONINA Y HEMINA COMO TRATAMIENTO
ANTIOXIDANTE Y ANTIRREMODELANTE PARA LA
HIPERTENSIÓN PULMONAR EN NEONATOS DE OVEJA
GESTADOS EN HIPOXIA CRÓNICA.

Presentada en la Universidad de Chile
Para optar al Grado de Doctor en Farmacología

Por:

ALEJANDRO ANTONIO GONZALEZ CANDIA

Director de tesis

Dr. Emilio Augusto Herrera Videla

Dr. Jorge Aníbal Llanos Mancilla

Santiago-Chile

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
Informe de Aprobación
Tesis de Doctorado

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

ALEJANDRO ANTONIO GONZALEZ CANDIA

Ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 18 de julio de 2019.

Director de Tesis:

Dr. Emilio Augusto Herrera Videla. _____

Dr. Jorge Aníbal Llanos Mancilla. _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Ramón Rodrigo Salinas. _____

Dr. Hernán Speisky Cosoy. _____

Dra. Paola Morales Retamales. _____

“Son cosas chiquitas. No acaban con la pobreza, no nos sacan del subdesarrollo, no socializan los medios de producción y de cambio, no expropián las cuevas de Ali Babá. Pero quizá desencadenen la alegría de hacer, y la traduzcan en actos. Y al fin y al cabo, actuar sobre la realidad y cambiarla, aunque sea un poquito, es la única manera de probar que la realidad es transformable”.

Eduardo Galeano, *“Las ganas de hacer”*

Financiamiento.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Fondecyt Regular 1151119, titulado *To be born high and flat (Andean Altiplano): healing vascular function and pulmonary arterial hypertension by a combined treatment in neonatal lambs.*

Publicaciones Científicas.

Internacionales.

- **Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep** Alejandro Gonzalez-Candia, Marcelino Veliz, Catalina Carrasco-Pozo, Rodrigo L. Castillo, J. Cesar Cárdenas, Germán Ebensperger, Roberto V. Reyes, Aníbal J. Llanos, Emilio A. Herrera. *Redox Biology* **22 (2019): 101128.**

Nacionales.

- **El tratamiento postnatal con melatonina modula la expresión de agentes prostanoides en pulmón de neonatos de oveja con hipertensión pulmonar.** Simón A. Aguilar, Pamela V. Arias, Ignacio Canquil, Germán Ebensperger, Aníbal J. Llanos, Roberto V. Reyes PhD, Alejandro González-Candia, Emilio A. Herrera. *Rev Med Chile* **2019; 147.**

Premios y presentaciones a congresos.

- **Postnatal melatonin treatment improves pulmonary vascular function even after treatment withdrawal in chronic hypoxic newborn sheep** González- Candia A., Candia AA., Ebensperger G., Reyes RV., Llanos AJ., Herrera EA. XII Annual Meeting of Latin American Society for Materno Fetal Interaction and Placenta. Puerto Varas, Chile. Abril, 2017.
- **Postnatal melatonin improves pulmonary vascular function even after one week of treatment completion in pulmonary hypertensive lambs.** González-Candia A., Figueroa EG., Candia AA., Feixes E., Gonzalez-Candia C., Aguilar SA., Astorga CR., Reyes RV., Ebensperger G., Llanos AJ., Herrera EA. 44th Annual Meeting Fetal and Neonatal Physiological Society, Cambridge, Reino Unido. Septiembre, 2017.
- **Pharmacological effect of melatonin as a treatment for pulmonary hypertension in neonatal lambs gestated under chronic hypoxia.** González-Candia A., Figueroa EG., Candia AA., González-Candia C., Reyes RV., Ebensperger G., Llanos AJ., Herrera EA. XI Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile. Noviembre, 2017.
- **Melatonin and hemin as treatment for pulmonary hypertension in neonatal sheep born in chronic hypoxia.** González-Candia A., Candia AA., Ebensperger G., Reyes RV., Llanos AJ., Herrera EA. 45th Annual Meeting Fetal and Neonatal Physiological Society, Maastricht, Holanda. Junio, 2018.

- **Neonatal treatment with hemin and melatonin reverts pulmonary vascular dysfunction in neonatal sheep with pulmonary hypertension born in chronic hypoxia.** González-Candia A., Candia AA., Figueroa EG., Gonzalez-Candia C., Ebensperger G., Reyes RV., Llanos AJ., Herrera EA. 3rd Meeting of Ibero-American DOHaD chapter, Cancún, México. Noviembre, 2018.
- **Melatonin and Hemin treatment in neonatal pulmonary hypertension improves molecular markers of vascular function.** Candia AA., González-Candia A., Ebensperger G., Reyes RV., Llanos AJ., Herrera EA. 13th PVRI Annual World Congress on PVD, Barcelona, España. Febrero, 2019.
- **Cardiopulmonary effect and pharmaceutical safety of a therapy composed by Melatonin, Hemin and Sildenafil, as a treatment for pulmonary hypertension in neonatal sheep born at high-altitude.** González-Candia C., González-Candia A., Reyes RV., Ebensperger G., Llanos AJ., Herrera EA. III Meeting on Research and Innovation in Vascular Health and V Research Meeting on Hypertension in Pregnancy. Chillan, Chile. Abril, 2019.

INDICE

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen	11
Abstract	13
Introducción	
1. Transición Feto-Neonatal.....	15
2. Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar Neonatal de Altura.....	17
2.1 Hipertensión Pulmonar Neonatal y Vasoconstricción Pulmonar.....	18
2.1.1. Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica.....	18
2.1.2. Mecanismos Moleculares de la Vasoconstricción Pulmonar.....	19
2.2 Hipertensión Pulmonar Neonatal y Remodelamiento Vascular.....	22
3. Hipertensión Pulmonar Neonatal y Estrés Oxidativo.....	24
3.1. Hipoxia y Estrés Oxidativo.....	24
3.2. Fuentes Celulares de ROS y Maquinaria Antioxidante.....	26
4. Estrategias Farmacológicas para la Hipertensión Pulmonar Neonatal.	31
5. Estrategia Antioxidante para tratar la Hipertensión Pulmonar Neonatal: Utilización de la Neurohormona Melatonina.....	33
5.1 Biosíntesis de Melatonina.....	35
5.2 Dianas celulares de la Melatonina.....	37
6. Estrategia Antirremodelante para tratar la Hipertensión Pulmonar Neonatal: Utilización de Hemina.....	40
6.1. El monóxido de carbono a nivel vascular.....	40
6.2. Sistema HO-CO.....	43
6.3. Características terapéuticas del sistema HO-CO.....	44
6.4. Inducción del sistema HO-CO por hemina.....	48
7. Tratamiento combinado antioxidante-antiremodelante.....	49
Hipótesis	51
Objetivo general	51
Objetivo específicos	52

Materiales y Métodos

1. Animales.....	53
2. Registro <i>in vivo</i> de las variables cardiopulmonares.....	55
3. Ensayo <i>ex vivo</i> de la función vascular en arterias de resistencia pequeñas pulmonares.....	56
4. Determinaciones <i>in vitro</i>	58
4.1. RT PCR semicuantitativo en tejido pulmonar.....	58
4.2. Expresión de proteínas en tejido pulmonar.....	60
4.3. Determinaciones colorimétricas en tejido pulmonar.....	62
5. Análisis histomorfométrico en tejido pulmonar.....	65
6. Medición de las variables farmacocinéticas asociadas a la administración de la terapia combinada.....	66
7. Expresión de resultados y análisis estadístico.....	67

Resultados

Objetivo Específico 1	68
Determinar <i>in vivo</i> la función cardiopulmonar durante el tratamiento, mediante monitoreo cardiopulmonar diario.	
Objetivo Específico 2	83
Determinar <i>ex vivo</i> la función vascular pulmonar en arterias de resistencia usando fármacos vasoactivos mediante miografía de alambre.	
Objetivo Específico 3	90
Determinar <i>in vitro</i> la expresión y actividad de moléculas relacionadas con la función vasodilatadora y vasoconstrictora en tejido pulmonar, mediante ensayos de biología molecular y bioquímica.	
Objetivo Específico 4	102
Determinar el nivel de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en tejido pulmonar.	
Objetivo Específico 5	109
Determinar la histomorfometría, marcadores de proliferación y de remodelamiento de arterias de resistencia pulmonar.	
Objetivo Específico 6	114
Determinación de las variables farmacocinéticas.	
Resultados Suplementarios.....	117

Discusión	122
Conclusiones finales	141
Bibliografía	142

Índice de Figuras.

Figura 1. Fisiopatología de la HPN.....	18
Figura 2. Imagen representativa de los mecanismos involucrados en la HPN.....	21
Figura 3. Modelo propuesto para la generación de ROS en función de la PO ₂	25
Figura 4. ROS y función vasodilatadora.....	27
Figura 5. Síntesis de melatonina.....	36
Figura 6. Vías de acción celulares de melatonina.....	38
Figura 7. Sistema HO-CO y sus efectos cardiovasculares.....	45
Figura 8. Esquema temporal del protocolo experimental en los neonatos de ovejas gestados, nacidos y estudiados en tierras altas.....	56
Figura 9. Presión arterial pulmonar I.....	71
Figura 10. Presión arterial pulmonar II.....	72
Figura 11. Resistencia vascular pulmonar I.....	73
Figura 12. Resistencia vascular pulmonar II.....	74
Figura 13. Gasto cardíaco I.....	75
Figura 14. Gasto cardíaco II.....	76
Figura 15. Frecuencia cardíaca I.....	77
Figura 16. Frecuencia cardíaca II.....	78
Figura 17. Presión arterial sistémica I.....	79
Figura 18. Presión arterial sistémica II.....	80
Figura 19. Resistencia vascular sistémica I.....	81
Figura 20. Resistencia vascular sistémica II.....	82
Figura 21. Respuesta vasoconstrictora a potasio (KCl).....	84
Figura 22. Respuesta vasoconstrictora a serotonina (5HT).....	85
Figura 23. Respuesta vasoconstrictora a endotelina-1.....	86
Figura 24. Respuesta vasoconstrictora a tromboxano.....	86
Figura 25. Respuesta vasodilatadora a metacolina (Metch).....	88

Figura 26. Respuesta vasodilatadora a metacolina (Metch) con bloqueo de eNOS.....	88
Figura 27. Respuesta vasodilatadora a nitroprusiato de sodio (SNP).....	89
Figura 28. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía serotoninérgica.....	91
Figura 29. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía de endotelina 1.....	92
Figura 30. Expresión de mensajero (mRNA) de vasodilatadores.....	93
Figura 31. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía PGIs-IP.....	94
Figura 32. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía TXs-Tp.....	95
Figura 33. Expresión de proteína de las hemoxigenasa y BKCa.....	96
Figura 34. Expresión de proteínas de la vía oxidonitrérgica.....	97
Figura 35. Expresión de proteínas de las ciclooxigenasas.....	98
Figura 36. Expresión de proteínas de la vía PGIs-Ip.....	100
Figura 37. Expresión de proteínas de la vía TXs-Tp.....	101
Figura 38. Traslocación de citoplasma/membrana de p47phox.....	103
Figura 39. Expresión de proteína de la subunidad p47 fosforilada (ser370)..	104
Figura 40. Actividad de la xantino oxidasa (XO).....	105
Figura 41. Cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes en tejido pulmonar.....	106
Figura 42. Cuantificación de 8 isoprostanos (8-iso Prostaglandina F2 α) en tejido pulmonar.....	107
Figura 43. Expresión de marcadores de estrés oxidativo pulmonar.....	108
Figura 44. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar I.....	110
Figura 45. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar II.....	111
Figura 46. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar III.....	112
Figura 47. Densidad celular de la capa media en arterias de resistencia pulmonar.....	113
Figura 48. Proliferación celular en arterias de resistencia pulmonar.....	113
Figura 49. Perfil farmacocinetico de melatonina.....	114
Figura 50. Perfil farmacocinetico de hemina.....	115

Figura 51. (Suplementaria 1). Peso corporal.....	118
Figura 52. (Suplementaria 2). Largo cabeza-cola.....	119
Figura 53. (Suplementaria 3). Diametro biparietal.....	120
Figura 54. (Suplementaria 4). Diametro abdominal.....	121
Figura 55. Esquema representativo de los hallazgos obtenidos.....	139

Índice de Tablas.

Tabla 1. Partidores y protocolos de PCR.....	59
Tabla 2. Anticuerpos utilizados y condiciones de Western Blot.....	62
Tabla 3. Resumen de las Variables Farmacocinéticas obtenidas desde una administración oral de melatonina.....	115
Tabla 4. Resumen de las Variables Farmacocinéticas obtenidas desde una administración subcutánea de hemina.....	116

Abreviaturas.

AMPC	Adenosina mono fosfato cíclico.
AP-1	Proteína activadora 1
AANAT	Aralkylamine N-acetyltransferasa
AFMK	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamina.
ASMT	Acetylserotonina O-Methyltransferasa.
BHT	Butilhidroxitolueno.
BH4	Tetrahidrobiopterina.
BKCa	Canal de potasio de alta conductancia dependiente de calcio.
C	Grupo Control.
CAT	Catalasa.
CCR	Curvas concentración respuesta.
cDNA	Acido desoxiribonucleico complementario.
CO	Monóxido de Carbono.
COX-1	Ciclooxigenasa 1.
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfato.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.
ETa	Receptor de endotelina tipo a
ETb	Receptor de endotelina tipo b
ET-1	Endotelina 1
FADH2	flavín adenín dinucleótido reducido.
FC	Frecuencia cardiaca.
FDA	Food and Drug Administration.
Fe²⁺	Ion ferroso
Fe³⁺	Ion ferrico
GC	Gasto cardiaco.
GCs	Guanilato ciclasa soluble.
Gi	Proteína G inhibitoria.

Gq	Proteína G asociada a fosfoinositidasa.
GMPc	Guanosina mono fosfato cíclico.
GPCR	Receptor acoplado a proteína G.
GPx	Glutación peroxidasa.
H	Grupo hemina.
h	Horas.
HCl	Ácido clorhídrico.
Hif 1α	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia.
HO	Hemoxigenasa.
HO-1	Hemooxigenasa 1.
HO-2	Hemoxigenasa 2
HO-3	Hemoxigenasa 3.
HPN	Hipertensión pulmonar neonatal.
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno.
iNOS	Óxido nítrico endotelial inducible.
IL-10	Interleucina 10.
Im	Intramuscular.
Ip	Receptor de prostaglandina I ₂ .
KCl	Cloruro de potasio.
Kg	Kilogramos.
KH₂PO₄	Fosfato di ácido de potasio.
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje.
LPS	Lipopolisacarico.
M	Grupo melatonina.
mg	Miligramos.
MgSO₄	Sulfato de magnesio.
MH	Grupo melatonina-hemina.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
MT 1	Receptor de melatonina 1
MT 2	Receptor de melatonina 2.
NA	Noradrenalina.

NaCl	Cloruro de sodio.
NaHCO₃	Carbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NADH	Nicotina adenina dinucleótido reducida.
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NO	Óxido nítrico.
Nrf2	Factor Nuclear eritroide 2.
NSQ	Núcleo supraquiasmático.
O₂⁻	Anión superóxido.
OH•	Radical hidroxilo.
PBS	Tampón fosfato salino.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAS	Presión arterial sistémica.
PAP	Presión arterial pulmonar.
PGI₂	Prostaglandina I ₂ .
PDE-5	Fosfodiesterasa 5.
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc.
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMPc
PO₂	Presión de oxígeno.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa es tiempo real.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.
RVP	Resistencia vascular pulmonar.
RVS	Resistencia vascular sistémica.
sc	Subcutáneo.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SNP	Nitroprusiato de sodio.
SOD	Superóxido dismutasa.
T°	Temperatura.
TLR	Receptor tipo toll.

Tp	Receptor de tromboxano.
TPH	L-triptofano hidroxilasa.
TX₂	Tromboxano A2.
μL	Microlitros.
μm	Microgramos.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
XO	Xantina oxidasa.

Resumen

La hipertensión pulmonar neonatal generada por hipoxia crónica perinatal es una condición fisiopatológica definida por una alterada reactividad arterial y remodelamiento vascular a nivel pulmonar. Este síndrome se caracteriza por presentar presiones mayores o iguales a 25 mmHg de PAPm en neonatos gestados y nacidos en alturas mayores a 2500 msnm. En este contexto, la hipoxia crónica y el estrés oxidativo son los principales factores desencadenantes de esta patología. Esta tesis propone un nuevo enfoque terapéutico con una combinación de dosis bajas de un vasodilatador pulmonar vascular y agente antioxidante como la melatonina y un antirremodelante vascular como la hemina, con la finalidad de aumentar la capacidad vasodilatadora y disminuir el remodelamiento a nivel pulmonar.

Dieciocho corderos gestados, nacidos y estudiados en Putre (3600 msnm) fueron utilizados en esta tesis. De estos, 5 recibieron vehículo, 5 recibieron tratamiento combinado melatonina-hemina (melatonina 1mg/Kg y hemina 10mg/Kg), 5 recibieron melatonina (1mg/Kg) y 3 recibieron hemina (10mg/Kg). Durante el primer mes de vida, se registraron diariamente las variables cardiopulmonares. Después de 1 semana de finalizado el tratamiento, se obtuvo tejido vascular y pulmonar para evaluar función arterial, expresión de genes, proteínas vasoactivas, y características histológicas.

El tratamiento combinado logró aumentar *ex vivo* la vasodilatación dependiente de endotelio, aumentado la expresión de la vía de prostaciclina (PGI₂-Ip) y la vía oxidonitrérgica (NO-GMPc-PKG). Esto se asoció a una

disminución del estrés oxidativo a nivel pulmonar en el grupo con tratamiento combinado, disminuyendo la expresión de 8 isoprostanos y nitrotirosina como marcadores de estrés oxidativo. En contraste, no hubo cambios a nivel estructural en las arterias pulmonares. En conclusión, el tratamiento propuesto generó cambios en la vasorreactividad y tono oxidativo pulmonar, aunque estos no se tradujeron en modificaciones de la presión arterial pulmonar o en la estructura vascular.

Abstract

Neonatal pulmonary hypertension generated by perinatal chronic hypoxia is a pathophysiological condition defined by altered arterial reactivity and vascular remodeling at the pulmonary level. This syndrome is characterized by presenting pressures equal or greater than 25 mmHg of PAPm in neonates gestated and born at 2500 masl. In this context, chronic hypoxia and oxidative stress are the main triggers of this pathology. This thesis proposes a new therapeutic approach with a combination of low doses of a vascular pulmonary vasodilator and antioxidant agent such as melatonin, and a vascular anti-remodeling agent such as hemin, in order to increase vasodilator capacity and decrease remodeling at the pulmonary level.

Eighteen lambs, gestated, born and studied in Putre (3600 masl) were used in this thesis. Of these, 5 received vehicle, 5 received combined treatment melatonin-hemin (melatonin 1mg/Kg and hemin 10mg/Kg), 5 received melatonin (1mg / Kg) and 3 received hemin (10mg / Kg). During the first month of life, cardiopulmonary variables were recorded daily. After 1 week of treatment completion, vascular and pulmonary tissue was obtained to evaluate arterial function, vasoactive gene, protein expression, and histological aspects.

The combined treatment was able to increase endothelium-dependent vasodilation *ex vivo*, and further increase the expression of the prostacyclin (PGI₂-Ip) and oxidonitric (NO-cGMP-PKG) pathways. This was associated with a decreased expression of 8-isoprostanes and nitrotyrosine as markers of oxidative stress, in the group with combined treatment. In contrast, there were

no structural changes in the pulmonary arteries. In conclusion, the proposed treatment induces changes in the pulmonary vasoreactivity and oxidative tone, although these did not translate into changes in pulmonary arterial pressure or vascular structure.

INTRODUCCIÓN

1. Transición Feto-Neonatal.

Durante la vida fetal, el intercambio gaseoso se lleva a cabo por la placenta. En el feto, el pulmón no tiene un papel fisiológico respiratorio, sin embargo cumple funciones metabólicas que incluyen la secreción de hormonas, la conversión enzimática de sustancias inactivas a moléculas funcionales, y la degradación de metabolitos activos (Rudolph, 1979). La transferencia de oxígeno al feto se produce por difusión a través de la barrera placentaria, por un mecanismo de gradiente fisicoquímico, impulsado por la diferencia de presiones parciales feto-placentaria. En la vida fetal, existe una alta resistencia vascular pulmonar (RVP) que desvía el 85-90% del gasto cardiaco derecho por el ducto arterioso hacia la aorta descendente fetal. Como consecuencia el flujo sanguíneo pulmonar es muy bajo, no mayor a 7-10% del gasto cardiaco combinado (Heymann, 1999). Los mecanismos que dan cuenta de la alta RVP fetal incluyen una baja presión parcial de oxígeno, baja producción de vasodilatadores con un incremento en vasoconstrictores, un desarrollo parcial de la vasculatura pulmonar y la existencia de una capa muscular gruesa en arteriolas fetales pulmonares, lo que genera una dominancia de un tono vascular vasoconstrictor (Heymann, 1999).

Al nacer, el sistema circulatorio pulmonar y sistémico fetal cambian en pocos minutos, donde las intercomunicaciones vasculares fetales se ocluyen, los primeros movimientos respiratorios provocan la reabsorción del líquido pulmonar y el llenado de los alvéolos pulmonares por aire. Todo esto pone en

marcha la dilatación de la circulación pulmonar, lo cual se asocia a una importante caída en la RVP, permitiendo un aumento de casi 10 veces el flujo de sangre en el pulmón, comenzando así el intercambio gaseoso (Abman, 1999). Dentro de los mecanismos determinantes de esta instauración de la función pulmonar están el inicio de la ventilación pulmonar, la tensión superficial de la interfase aire-líquido, el aumento de la oxigenación, el incremento del estrés tangencial, el aumento de agentes vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGI₂), y la disminución de agentes vasoconstrictores como endotelina (ET-1) y tromboxano (TXA) (Hooper y Wallace, 2006). De todos estos eventos fisiológicos post-natales, el principal determinante de la correcta transición feto-neonatal es el aumento de la PO₂, el cual favorece la expresión y mantención de los agentes vasodilatadores antes mencionados (Peñaloza y Arias Stella, 2007). La falla en la disminución de la RVP al nacer determina un aumento en la presión arterial pulmonar (PAP), pudiendo inducir una patología conocida como hipertensión pulmonar del neonato, la cual lleva a una dificultad respiratoria grave e hipoxemia, comprometiendo la vida y el desarrollo postnatal. Esta enfermedad afecta principalmente a las arterias pequeñas de resistencia, que son las determinantes sustanciales del aumento sostenido de la RVP. Alteraciones *in utero* o en el parto como infecciones, hipoxia crónica y estrés oxidativo, entre otras, pueden perturbar los mecanismos antes descritos y retardar la adecuada transición pulmonar y desencadenar el cuadro de hipertensión arterial pulmonar del neonato (Steinhorn, 2010).

2. Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar Neonatal de Altura.

La hipertensión pulmonar neonatal (HPN) es una condición fisiopatológica definida como un aumento en la PAP media mayor a 25 mmHg, generalmente asociada con algún grado de hipoxemia como resultado de la falla de generar una caída en la resistencia vascular pulmonar al nacimiento. Esta condición se caracteriza por una elevada RVP, reactividad vascular anormal y remodelamiento del músculo liso vascular (Steinhorn, 2010; Storme y cols, 2013). Sus causas pueden ser de tipo idiopática (10%) o secundaria a una variedad de condiciones, incluidas la asfixia intrauterina, infección, hipoplasia pulmonar, falla cardíaca congénita e hipoxia crónica (Figura 1) (Storme y cols, 2013; Simonneau y cols, 2013).

La incidencia de HPN es de 1-7/1.000 nacidos vivos en tierras bajas, aumentando el riesgo de morbi-mortalidad en los recién nacidos afectados (Walsh-Sukys y cols, 2000; Abman, 2007; Dakshinamurti, 2005). En contraste, en alturas mayores a 2.500 metros sobre el nivel del mar (msnm), las complicaciones respiratorias neonatales, como el síndrome de distrés respiratorio del recién nacido pueden alcanzar una dramática prevalencia de hasta un 10%, condición que incluye la HPN (Keyes y cols, 2003). En este contexto, la hipoxia crónica durante el embarazo promueve un incremento en la post-carga cardíaca por aumento de la resistencia vascular, lo cual lleva a un engrosamiento de las paredes ventriculares, de la aorta y la arteria pulmonar (Salinas y cols, 2010; van Patot y cols, 2012). Aunque la HPN es una patología que fue descrita hace más de 30 años, aún no se ha descifrado

claramente la totalidad de su etiología, y por tanto no existe un tratamiento definitivo y eficiente.

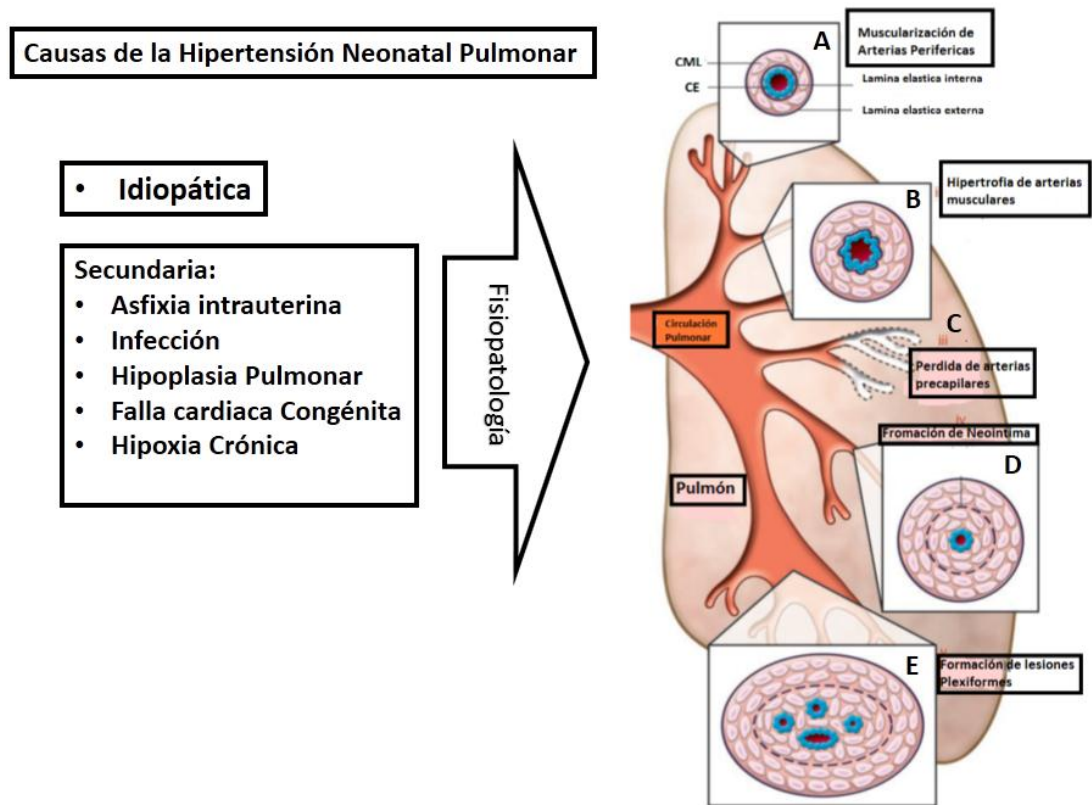


Figura 1. Fisiopatología de la HPN. Ilustración representativa de las causas y alteraciones vasculares pulmonares asociadas a la HPN. Las principales alteraciones se resumen en (A) remodelamiento anormal en arterias distales precapilares, (B) hipertrofia de la capa media de grandes arterias pulmonares, (C) pérdida de arterias precapilares, (D) formación de la capa neo íntima y (E) la formación de lesiones plexiformes, todo lo cual lleva a un aumento mantenido de la presión arterial pulmonar (Adaptado de Rabinovitch y cols, 2008).

2.1 Hipertensión Pulmonar Neonatal y Vasoconstricción Pulmonar.

2.1.1. Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica.

La vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) fue inicialmente identificada por *Bradford y Dean* (1894) y posteriormente caracterizada por *von Euler y Liljestrand* (1946). La VPH es un mecanismo homeostático que es

intrínseco a la vasculatura pulmonar, en la cual las arterias intrapulmonares se vasocontraen en respuesta a la hipoxia alveolar, desviando la sangre hacia segmentos pulmonares mejor oxigenados, optimizando así la relación ventilación/perfusión garantizando la oxigenación pulmonar. Esta respuesta es contraria a la generada a nivel sistémico, ya que a nivel periférico existe una respuesta vasodilatadora a la hipoxia para garantizar la perfusión a nivel local y asegurar el oxígeno para el metabolismo celular (Roy y Sherrington, 1890). Sin embargo, la hipoxia alveolar sostenida (hipoxia crónica) es un potente estímulo para generar una vasoconstricción pulmonar aumentada y sostenida en el tiempo. Esta vasoconstricción a nivel vascular tiene como efectores a células endoteliales y a células musculares, y se han postulado dos mecanismos para sustentar este fenómeno. El primero se logra ya sea a través de la activación de una vía vasoconstrictora o la inactivación de una vía vasodilatadora y el segundo mecanismo es a través de los efectos de la hipoxia en el músculo liso vascular (Sylvester y cols, 2012).

2.1.2. Mecanismos Moleculares de la Vasoconstricción Pulmonar.

Se ha descrito que la vasoconstricción pulmonar es uno de los componentes principales que afectan el aumento de la PAPm en los recién nacidos gestados en altura. El primer mediador descrito es la endotelina-1 (ET-1), secretada principalmente por células endoteliales y que actúa a través de los receptores ETA, que se expresan principalmente en células del músculo liso. En contraste, los receptores ETB, que se expresan principalmente en células endoteliales. Ambos receptores pueden mediar la

proliferación en el músculo liso, sin embargo, la activación del receptor ETA genera vasoconstricción y la activación de ETB genera vasodilatación en células endoteliales. Bajo hipoxia crónica, la sensibilidad de ET-1 en arterias pulmonares esta aumentada (Herrera y cols, 2010). De igual forma, datos experimentales sugieren que en un modelo de hipertensión pulmonar por hipoxia crónica, el receptor ETA se encuentra regulado positivamente contribuyendo al fenotipo vasoconstrictor, tal como se observa en la Figura 2 (Papamatheakis y cols, 2013).

El segundo mediador es el tromboxano, que es un potente vasoconstrictor, un mitógeno del músculo liso, y un inductor de la agregación plaquetaria, producido por células endoteliales y plaquetas. De esta manera, en estudios de hipertensión pulmonar neonatal, se ha observado un aumento de la producción de tromboxano A₂ (Christman y cols, 1992). La serotonina (5-HT) corresponde a otro mediador de esta vía, al ser uno de los vasoconstrictores más potentes. Esta molécula de señalización causa vasoconstricción predominantemente a través de la activación de los receptores 5-HT₂ acoplados a proteína G_q (G_q) en las células musculares lisas. Una pequeña porción de su capacidad vasoconstrictora es a través de la activación de receptores 5-HT₁ acoplado a proteína G_i (G_i) que reducen adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Hood y cols, 2017). La 5-HT puede tener un rol importante en la patogénesis de la hipertensión pulmonar neonatal y en la vasoconstricción arterial pulmonar serotonina-dependiente, la cual es afectada por la condición de hipoxia crónica fetal (Blood y cols, 2013). Debido a que la mayor parte de estos mediadores pueden afectar el crecimiento de

las células del músculo liso, una alteración en su producción puede facilitar el desarrollo de la hipertrofia vascular pulmonar y la remodelación característica estructural de la HPN (Figura 2).

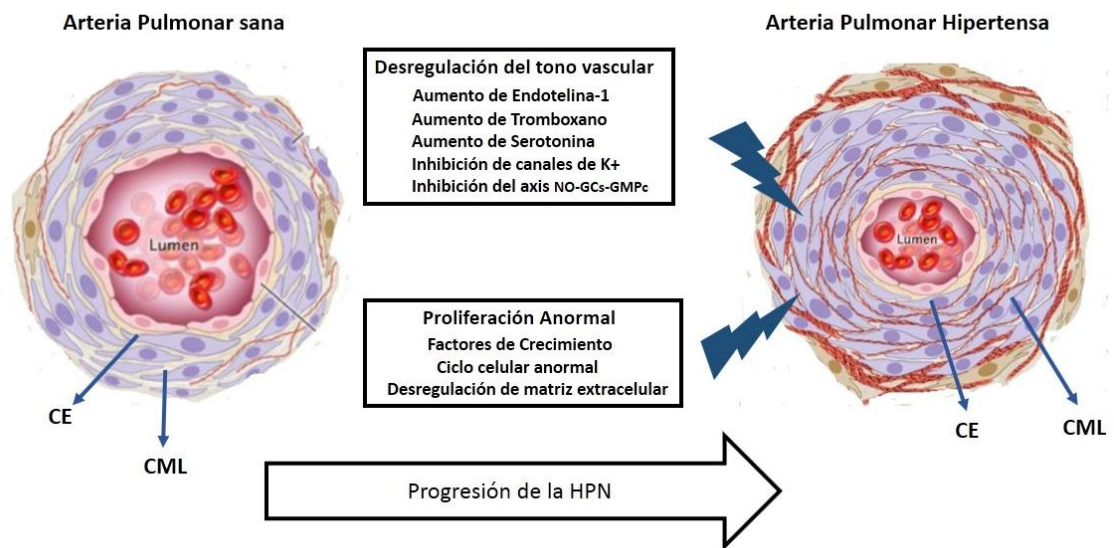


Figura 2. Imagen representativa de los mecanismos involucrados en la HPN. La figura representa los cambios morfoestructurales de la progresión de la HPN. EC (célula endotelial) y SMC (célula de músculo liso).

Finalmente, otro de los mecanismos por el cual la hipoxia produce vasoconstricción es mediante la inhibición de uno o más canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) en las células del músculo liso a nivel vascular pulmonar, en especial en las arterias pulmonares de resistencia. El efecto fisiológico que genera esta inhibición es una despolarización de membrana que aumenta la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, elevando la biodisponibilidad de calcio citosólico, favoreciendo así, la vasoconstricción. Esta aseveración es respaldada por estudios que demuestran que el canal Kv1.5 está regulado negativamente en las células

del músculo liso de las arterias pulmonares en humanos con HPN (Yuan y cols, 1998), y que tanto Kv1.5 como Kv2.1 están regulados negativamente en ratas con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica (Michelakis y cols, 2002). Adicionalmente, estudios de *microarrays* de ácido desoxirribonucleico han mostrado que existe una regulación negativa en los genes de canales de tipo Kv en los pulmones con hipertensión arterial pulmonar. La pérdida selectiva de estos canales Kv conduce tanto al fenotipo vasoconstrictor como a la proliferación celular vascular pulmonar (Geraci y cols, 2001).

2.2 Hipertensión Pulmonar Neonatal y Remodelamiento Vascular.

El remodelamiento vascular involucra modificaciones en la estructura y arquitectura de la pared vascular como una respuesta adaptativa a estímulos ambientales. En esta adaptación, están involucrados procesos celulares como diferenciación, proliferación y apoptosis. En el cuadro de la HPN inducida por hipoxia crónica, se observa un engrosamiento de la pared vascular y una disminución del lumen arterial. El engrosamiento de la capa media es atribuible a la hipertrofia, al aumento de la acumulación de células del músculo liso y al aumento de la deposición de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno y elastina (Figura 2). Por otro lado, el engrosamiento observado en la capa adventicia está causado por la acumulación de fibroblastos y miofibroblastos y a un aumento marcado en la acumulación de matriz extracelular (colágenos, elastina y fibronectina) (Stenmark y cols, 2006; Herrera y cols, 2008). El remodelamiento vascular observado en esta

patología, es un proceso complejo a nivel arterial, debido a que las poblaciones de células que componen las diferentes capas arteriales son variables. Es así como se pueden encontrar células musculares lisas inmaduras que sobreexpresan α -actina, diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en la adventicia, además de migración y proliferación de estos tipos celulares a la capa media y eventualmente a la capa íntima. Los miofibroblastos expresan algunos marcadores de músculo liso como α -actina, los que presentan una activación lenta a estímulos contráctiles y una baja respuesta a estímulos vasodilatadores (Stenmark y cols, 2006).

El remodelamiento además, modifica la capacidad angiogénica del pulmón en el cuadro de HPN, tal como se ha demostrado en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este factor se encuentra aumentado en la hipertensión pulmonar y modula el remodelamiento vascular inducido por hipoxia crónica (Partovian y cols, 2000), siendo responsable del desarrollo vascular normal del pulmón y modulando la alveolarización. Por estas razones, una terapia que potencie la señalización de VEGF podría representar una propuesta beneficiosa para el tratamiento de la hipertensión pulmonar neonatal (Budhiraja, 2004). Interesantemente para esta Tesis, se ha demostrado que melatonina disminuye la expresión de HIF-1 α y VEGF, atenuando el remodelamiento y aumentando la alveolarización en tejido pulmonar (Astorga y cols, 2018). Estos datos, además, sugieren que la capacidad antioxidante de melatonina podría estar mediando positivamente una reversión del remodelamiento vascular pulmonar en HPN.

3. Hipertensión Pulmonar Neonatal y Estrés Oxidativo.

3.1. Hipoxia y Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo se define como un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del organismo o una alteración del balance prooxidante/antioxidante, favoreciendo así, la probabilidad de que se produzca un daño oxidativo de moléculas (Sies, 1986). Las ROS son moléculas generadas por el metabolismo celular, que en bajas concentraciones funcionan como mediadores de una gran variedad de funciones fisiológicas como la modulación de la replicación y diferenciación celular, procesos inflamatorios y agentes vasoactivos entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2004). Sin embargo, las condiciones que se relacionan al aumento de las ROS, se han vinculado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca, lesión por isquemia-reperfusión y accidente cerebrovascular. Clanton (2007) propuso un mecanismo para la generación de ROS bajo la condición de hipoxia crónica (Figura 3), sugiriendo que la hipoxia es un estado que se caracteriza por estar en un ambiente reductor a nivel celular. Esto genera una elevación de equivalentes reductores como NADH y FADH₂, que se acumulan significativamente en la mitocondria. Estos equivalentes reductores contribuyen a generar electrones disponibles para reacciones de reducción, tales como la reducción de O₂ a anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$).

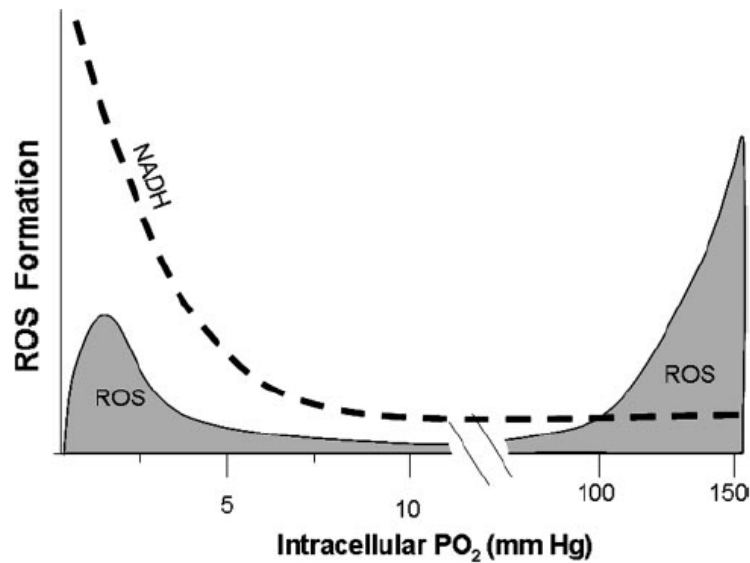


Figura 3. Modelo propuesto para la generación de ROS en función de la PO₂. Se puede observar que tanto la hipoxia como la hiperoxia representan condiciones celulares para la generación de ROS, favoreciendo al estrés oxidativo (Adaptado de Clanton, 2007).

Por lo tanto, durante un estado de hipoxia, la producción de ROS estará dada por una acumulación de especies reductoras (tasa alta de NADH /NAD⁺) como fuente de electrones y O₂ disponibles para reaccionar (Figura 3). En este sentido, se ha demostrado que incluso a 1 mmHg PO₂, hay entre 1,3 y 6,5 μM de O₂ disponible para reaccionar (Clanton, 2007). Estas especies reducidas (NADH, FADH₂, y NADPH) no reaccionan directamente con O₂, si no que con centros de reacción que pueden ayudar a ceder electrones. Estos centros de reacción son catalizadores que generalmente incluyen enzimas tales como la xantina oxidasa, NAD(P)H oxidasa, o la ciclooxigenasa; transportadores de electrones tales como ubiquinona; y *clusters* de azufre u otros centros metálicos tales como enzimas peroxidasa. Por lo tanto, la disponibilidad de estos catalizadores en su estado redox apropiado sería un

componente necesario para la generación de las ROS en un estado de hipoxia celular.

3.2. Fuentes Celulares de ROS y Maquinaria Antioxidante.

Dentro de las ROS generadas por el metabolismo celular, el radical $\bullet\text{O}_2^-$ es una de las moléculas más reactivas, la cual es neutralizada rápidamente, evitando sus efectos tóxicos. La primera línea de defensa es la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya acción cataliza la dismutación del radical $\bullet\text{O}_2^-$ en oxígeno y peróxido de hidrógeno. En el humano y en los mamíferos se han descrito tres isoformas según su ubicación y estructura, SOD 1 (citoplasma), SOD 2 (mitocondria) y SOD 3 (extracelular) (Miller, 2004). En una segunda etapa, la enzima catalasa (CAT) descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Similar función a la CAT cumple la glutatión peroxidasa (GPx), de la cual se han descrito 7 tipos, siendo la más común la tipo 1 (GPx 1), homotetrámero encontrado en citosol y matriz extracelular (Herbette y cols, 2007). La relación entre el desarrollo de la hipertensión y el aumento de la biodisponibilidad de ROS se atribuye a una disminución de la capacidad antioxidante, como se ha demostrado en el modelo de hipertensión pulmonar del neonato generado por hipoxia crónica (Torres y cols, 2015). Sin embargo, la producción de ROS también pareciera ser importante en la determinación de este balance redox en la HPN (Sylvester y cols, 2012; Gonzalez-Candia y cols, 2019). De hecho, las ROS generadas a nivel de la vasculatura influyen principalmente en la regulación de la contracción y el remodelamiento arterial. La generación de ROS se produce en todas las

capas de la pared vascular, incluidas las endoteliales y las del músculo liso. Los principales sistemas involucrados en la generación de estrés oxidativo a nivel vascular son: la mitocondria, la xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) desacoplada y NADPH oxidasa (Tabima y cols, 2012).

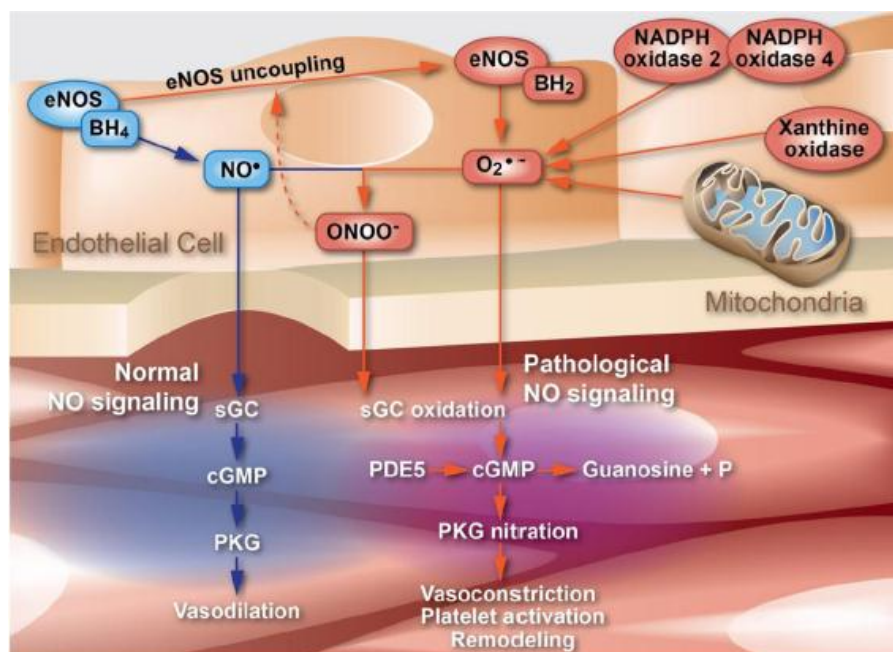


Figura 4. ROS y función vasodilatadora. Imagen representativa que relaciona las ROS y sus efectos en las vía vasodilatadora dependiente de NO en la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar (Tabima y cols, 2012).

El óxido nítrico (NO) es un gas que se sintetiza a partir de la oxidación de la L-arginina a través de la óxido nítrico sintasa (NOS) y que en sus productos genera NO y L-citrulina, en presencia de O_2 , de tetrahydrobiopterina (BH_4) y de NAPH como cofactores de la enzima. En particular, la isoforma eNOS tiene un rol central en la relajación de los vasos sanguíneos de diferentes territorios vasculares, incluyendo el pulmón (Budhiraja y cols, 2004). Las acciones vasodilatadoras del NO se sustentan en su primera interacción con la proteína guanilato ciclasa soluble (sGC) lo que produce un aumento del cGMP, el cual

activa a la proteína quinasa G tipo 1 (PKG-1), llevando a una disminución del Ca^{+} intracelular y la relajación del músculo liso vascular (Figura 4). Tanto el NO como sus vías de señalización se pueden ver alteradas por perturbaciones patológicas del potencial redox intracelular en el endotelio vascular y las células musculares lisas (Figura 4). Debido a que el radical $\bullet\text{O}_2^{-}$ tiene una alta afinidad por el NO y su reacción lleva a la formación de peroxinitrito, un aumento de éste es capaz de disminuir la biodisponibilidad de NO y por lo tanto impide sus funciones como vasodilatador y señalizador (Förstermann, 2010). A su vez, un aumento de peróxido de hidrógeno se ha relacionado con una disminución de los niveles de guanilato ciclasa soluble (sGC), proteína encargada de sintetizar cGMP. En condiciones patológicas de estrés oxidativo o nitrosativo, o cuando BH4 o L-arginina son deficientes, la NOS cambia estructuralmente, lo que resulta en la producción de $\bullet\text{O}_2^{-}$ en lugar de NO, lo que se conoce como eNOS desacoplada (Briones y Touyz, 2010). El paso crítico en el desacoplamiento es la oxidación de BH4 por el estrés oxidativo intracelular, lo que reduce la biodisponibilidad de este cofactor (Landmesser, 2003). Todo lo anterior puede derivar en una disfunción vascular y finalmente en patologías cardiopulmonares (Michel y Vanhoutte, 2010). La importancia del NO en el cuadro de hipertensión pulmonar del neonato ha derivado en las primeras aproximaciones terapéuticas, con el uso de NO inhalado en esta patología (Steinhorn, 2010; Jain & McNamara, 2015).

La familia Nox de NADPH oxidasa incluye Nox1, Nox3, Nox4, Nox 5. Las NADPH oxidasas son distintas bioquímicamente en su regulación, expresión y actividad, pero conservan su capacidad de utilizar NADPH como donante de

electrones para reducir el oxígeno molecular a radical $\bullet\text{O}_2^-$. Es importante destacar que Nox representa la fuente principal para la generación de ROS en las células musculares lisas de la pared vascular (Wedgwood, 2001), las células endoteliales (Chatterjee, 2008) y los fibroblastos (Pagano y cols, 1997). En este contexto, la evidencia indica que en la vasculatura pulmonar, las ROS derivadas de las enzimas NOX, en particular Nox1, Nox2 y Nox4, juegan un papel importante en la respuesta de tono contráctil en respuesta a hipoxia (Tabima y cols, 2012). Un gran número de factores de crecimiento y de agonistas de los receptores acoplados a proteínas G, tales como la serotonina y la endotelina-1, han demostrado que activan Nox. La activación de Nox por serotonina estimula la proliferación de células de músculo liso arterial pulmonar bovino a través de una vía que implica las MAP quinasas, ERK1 / 2 (Lee y cols, 2001).

La xantina oxidasa (XO) es otra fuente importante de radical $\bullet\text{O}_2^-$ en el endotelio vascular. XO cataliza los dos últimos pasos del metabolismo de la purina a través de la hidroxilación secuencial de hipoxantina para producir xantina y ácido úrico, proceso donde el oxígeno se reduce a $\bullet\text{O}_2^-$. La enzima puede existir en dos formas (sistema xantina oxidorreductasa) que difieren principalmente en su especificidad de sustrato oxidante. La forma deshidrogenasa utiliza preferentemente NAD^+ como aceptor de electrones y la forma oxidasa sólo reduce el oxígeno molecular. La conversión de la forma deshidrogenasa a la oxidasa de la enzima ocurre por ruptura proteolítica o por la oxidación de grupos tioles en los residuos Cys535 y Cys992, asociado al ambiente oxidativo celular. Así, la XO pasa de manera reversible a su forma

oxidasa que dona electrones al oxígeno molecular, produciendo de ese modo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y $\bullet\text{O}_2^-$. Esto sugiere su implicancia en el cuadro de disfunción vascular en la hipertensión pulmonar. Por ejemplo, en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas, se observaron niveles elevados de xantina oxidasa endotelial y aumento de producción de ROS, asociados a un aumento del tono arteriolar (Tabima y cols, 2012).

La mitocondria es otra importante fuente de ROS. Solo un pequeño porcentaje de O_2 utilizado por las mitocondrias no es completamente reducido a agua, y este se convierte en $\bullet\text{O}_2^-$ a causa de la fuga de electrones en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones. De hecho, bajo condiciones fisiológicas en células endoteliales y de músculo liso de arterias pulmonares, las mitocondrias producen ROS como subproductos del metabolismo aeróbico por los complejos de transporte de electrones. Se ha establecido que aproximadamente el 1-2% del oxígeno es convertido en $\bullet\text{O}_2^-$, y esta producción puede ser afectada por el estado redox citoplasmático. Sylvester y cols (2012) propusieron una hipótesis para la generación de ROS en el cuadro de hipertensión pulmonar asociada a hipoxia crónica y a la generación del fenotipo vasoconstrictor, la cual plantea que la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ se ve influenciada por la concentración de O_2 disponible y de donantes de electrones en el entorno mitocondrial (Sylvester y cols, 2012). Si la concentración de O_2 se reduce como en la hipoxia a niveles suficientes para limitar el transporte de electrones, entonces el entorno de la cadena transportadora de electrones mitocondrial estaría en un ambiente más reducido y la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ podría aumentar por un incremento de la

concentración de donantes de electrones. De esta manera, puede aumentar la generación de ROS mitocondrial, generando un desbalance oxidativo citoplasmático que afecta a las principales vías vasodilatadoras (Figura 4).

4. Estrategias Farmacológicas para la Hipertensión Pulmonar Neonatal.

El objetivo principal del tratamiento para la HPN es la generación de una vasodilatación pulmonar selectiva. En este sentido, el fármaco utilizado de primera línea es el NO inhalado (iNO). En 1999, el iNO fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en neonatos diagnosticados con HPN (Jain y McNamara, 2015). El iNO logra una vasodilatación pulmonar potente y selectiva sin presentar una vasodilatación sistémica. Esto ocurre, ya que en el espacio intravascular el NO se combina con la hemoglobina para formar metahemoglobina, que previene la vasodilatación sistémica (efecto selectivo). A nivel pulmonar el iNO mejora la relación V/Q, dilatando las arteriolas pulmonares adyacentes y redireccionando la sangre pulmonar hacia alveolos ventilados (Ehrenkranz, 1997). Resultados de diferentes ensayos multicéntricos han demostrado que el iNO usado en esta patología reduce la necesidad de utilizar ECMO (Oxigenación a través de membrana extra-corpórea) (Lönnqvist y cols, 1997). Un metaanálisis reveló que el 58% de los niños gestados en hipoxia a término, respondieron al iNO en 30 a 60 minutos (Luscher, 1992). Sin embargo, la *American Academy of Pediatrics* publica en el 2000 la guía que refiere que hasta un 40% de los recién nacidos no responden a la vasodilatación por iNO y una vez que el tratamiento es retirado, vuelve la vasoconstricción pulmonar

(efecto rebote) (*American Academy of Pediatrics*, 2000). A pesar de que el uso de iNO no reduce la mortalidad en ningún estudio analizado, sí demuestra disminuir la necesidad de una terapia con ECMO como mecanismo de rescate (Luscher, 1992).

Otra estrategia farmacológica utilizada es el uso de la prostaciclina (PGI₂), la cual tiene como finalidad activar la adenilato ciclasa y aumentar el AMPc en la célula del músculo liso arterial pulmonar. El uso inhalado de PGI₂ (Epoprostenol o iloprost) se ha descrito en numerosos estudios (*i.e.* Kelly y cols, 2002; Soditt y cols, 2007). Esta terapia puede actuar de forma sinérgica con iNO para causar una vasodilatación pulmonar eficaz y también prevenir la vasoconstricción de rebote observada durante el término del tratamiento con iNO como mono terapia. A pesar de que existe la presentación inhalada y endovenosa, no son comúnmente utilizadas debido a que la molécula inhalada se considera inestable al ser susceptible a la degradación por estrés oxidativo y a que la endovenosa se vincula a hipotensión sistémica.

Otra táctica utilizada con la finalidad de mejorar la vasodilatación dependiente de la vía oxidonitrérgica, es la utilización de inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), como el sildenafil, para así aumentar la biodisponibilidad de GMPc. Actualmente, este medicamento está disponible tanto en forma oral como intravenosa en los Estados Unidos, y está aprobado por la FDA sólo para adultos con hipertensión pulmonar. Los estudios han demostrado que el uso de sildenafil oral (rango de dosis 1-3 mg/kg cada 6 h) mejora la oxigenación y reduce la mortalidad, en especial en centros de salud en los cuales no existe

la disponibilidad de iNO, principalmente por su alto costo (Baquero y cols, 2006). El sildenafil intravenoso demostró ser eficaz en disminuir la PAP y RVP en modelos de HPN animales (Herrera y cols, 2008), además de mejorar la oxigenación en pacientes con HPN, con y sin exposición previa a iNO (Steinhorn, 2009). Sin embargo, al ser administrado sistémicamente el riesgo de efectos secundarios cardiovasculares, como la hipotensión asociada a la vasodilatación sistémica, es alto (Kelly y cols, 2017).

Finalmente, otra estrategia utilizada se relaciona con el bloqueo de la acción del receptor de endotelina-1 disminuyendo así la vasoconstricción (Ivy y cols, 1997). En este sentido, el prototipo farmacológico es el bosentán (Goissen y cols, 2008). Todas estas terapias, excepto iNO, no han sido aprobadas por la FDA para la HPN y se encuentran en fase experimental (Jain y McNamara, 2015). Además, ninguna de ellas logra resolver de manera definitiva la fisiopatología de la HPN, razón por la cual este trabajo doctoral propone una terapia alternativa a través de una combinación de melatonina, un antioxidante para prevenir el estrés oxidativo y mejorar la vasodilatación a nivel pulmonar y de hemina, un antirremodelante para tratar de revertir el remodelamiento patológico generado por la hipoxia crónica. Esta estrategia sugiere una nueva solución terapéutica para el cuadro clínico de la HPN.

5. Estrategia Antioxidante para tratar la Hipertensión Pulmonar Neonatal: Utilización de la Neurohormona Melatonina.

La maduración pulmonar determina la inducción antioxidante pre y postnatal (Asikainen & White, 2005). En el caso de los recién nacidos

prematuros o gestados en hipoxia crónica, la capacidad antioxidante se encuentra reducida en comparación a los recién nacidos a término y en condición de normoxia (Mamo y cols, 2004). De esta manera, si hay un aumento de ROS como en la HPN, o una disminución de la maduración de los pulmones, se podría generar una vasorreactividad anormal pulmonar. Es por esta razón que se esperaría que una terapia antioxidante mejore la condición de estrés oxidativo que presenta la HPN por hipoxia crónica.

La melatonina químicamente es una indolamina (N-acetil-5metoxitriptamina) muy conservada a lo largo de la evolución, encontrándose desde organismos muy primitivos como cianobacterias y algas unicelulares, hasta organismos pluricelulares como los mamíferos (Paredes y cols, 2009). Inicialmente se postuló que la síntesis de la melatonina tenía lugar en la glándula pineal, conectada con el núcleo supraquiasmático, lo que relacionaba su acción en el marco de la fisiología circadiana y reproductiva (Arendt y cols, 2005). Sin embargo, en la última década se ha comprobado que la mayor parte de los órganos y tejidos del organismo tienen las enzimas necesarias y la capacidad de síntesis de melatonina; entre estos se encuentran: retina, riñón, piel, hígado, timo, tiroides, páncreas, cerebelo, mucosa del intestino, epitelio respiratorio, ovarios, placenta y endometrio (Kvetnoy y cols, 2002). La existencia de melatonina tisular fue demostrada mediante qPCR, observándose la expresión de las dos enzimas claves para la biosíntesis de melatonina: la arialkilamina N-acetiltransferasas (AANAT) y la hidroxindol-O-metil transferasa o acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) (Stefulj y cols, 2001).

5.1 Biosíntesis de Melatonina.

La síntesis de melatonina se origina a partir del triptófano, aminoácido captado desde el torrente circulatorio por el pinealocito mediante un mecanismo de transporte activo que depende del sistema adrenérgico (Alonso y cols, 1999). En la mitocondria, el triptófano es hidroxilado por la enzima L-triptofano hidroxilasa (TPH) originándose 5-hidroxitriptofano. Posteriormente, sufre una descarboxilación mediada por la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa generándose 5-hidroxitriptamina o serotonina, esta enzima se encuentra en el citosol y su actividad está regulada por fibras simpáticas y requiere como cofactor fosfato de piridoxal (Snyder y cols, 1964). En este paso la molécula sufre una acetilación por acción de la enzima AANAT, originándose N-acetil-5-hidroxitriptamina. Luego, esta molécula se metila por la enzima ASMT produciéndose finalmente N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina. Una vez sintetizada en la glándula pineal, la melatonina es liberada rápidamente al sistema circulatorio, accediendo a todos los tejidos, compartimientos celulares y fluidos. Debido a que la melatonina no se acumula en la glándula pineal, los niveles de la hormona en sangre son considerados el principal índice de su síntesis pineal (Reiter y cols, 1991). La melatonina generada por la glándula pineal y que circula por el torrente

circulatorio, sigue un ritmo circadiano de liberación, con altos niveles plasmáticos nocturnos (Figura 5).

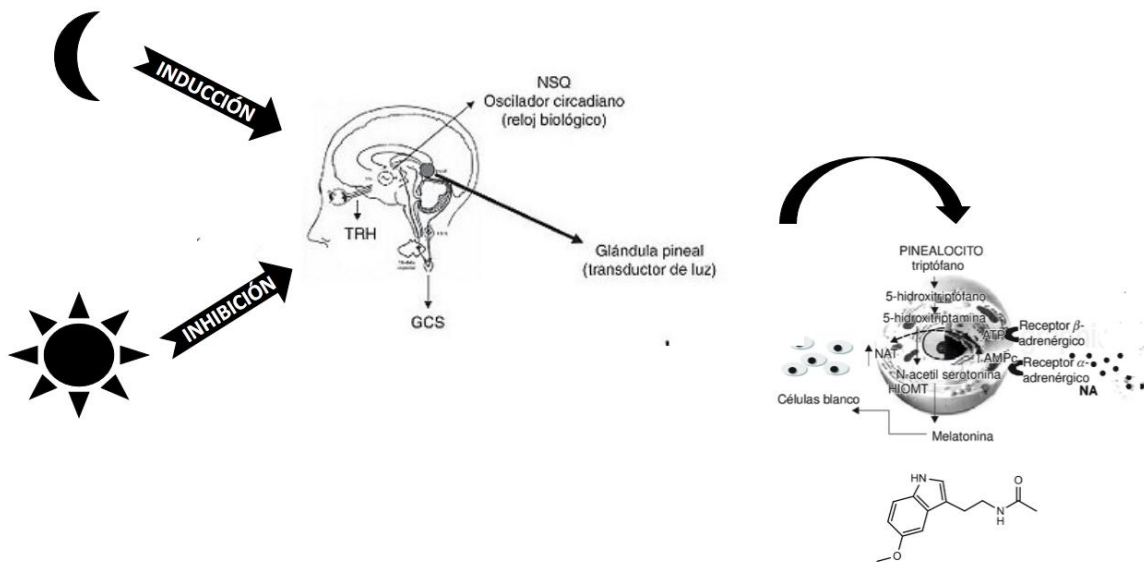


Figura 5. Síntesis de melatonina. La imagen representa la liberación de melatonina a través de la glándula pineal activada por el fotoperiodo. La secreción de melatonina es mediada por la vía retina-núcleo supraquiasmático-glándula pineal, dependiente de la inervación simpática a través de norepinefrina (Adaptado de Domínguez-Rodríguez y cols, 2012).

Los niveles diurnos oscilan entre 10 a 20 pg/ml, mientras que los nocturnos aumentan en promedio unas diez veces alrededor de las 2 a 3 de la madrugada (Klein y cols, 1991). En la glándula pineal, el incremento nocturno de la síntesis de melatonina es controlado por la liberación de norepinefrina (NA), a través de la inervación simpática de la glándula. Esta liberación está controlada por el reloj circadiano en el núcleo supraquiasmático (NSQ), que envía una señal estimuladora a la glándula pineal durante la noche a través de estructuras neuronales centrales y periféricas (Domínguez-Rodríguez y cols, 2012). El reloj circadiano del NSQ está sincronizado por el fotoperiodo a través del tracto retinohipotalámico, permitiendo que la estimulación de la

secreción de melatonina este acoplada al ciclo ambiental de luz/oscuridad (Figura 5).

Por otro lado, la melatonina producida por los tejidos permanece en el interior celular y no sale a la circulación, lo que sugiere que su acción biológica debe ser diferente a la de origen pineal (Reiter y Tan, 2003).

5.2 Dianas celulares de la Melatonina.

El descubrimiento de las dianas celulares sugiere una variedad de mecanismos de acción de melatonina, actuando a través de receptores (de membrana y nucleares) o a través de interacción directa. En la actualidad se han descrito tres mecanismos de acción de melatonina: 1) interacción con receptores de membrana, 2) interacción con receptores nucleares e 3) interacción directa (Figura 6) (Tordjman y cols, 2017).

El mecanismo mejor estudiado de melatonina es el mediado por receptores de membrana plasmática (MT1 y MT2). La clasificación entre MT1 y MT2 se basa en diferencias cinéticas y farmacológicas (Ng y cols, 2017). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR) y actúan modulando señales intracelulares, inhibiendo la adenilato ciclasa, lo que provoca una disminución en los niveles de actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la fosforilación de CREB (Tosini y cols, 2014). A nivel vascular, melatonina puede tener un efecto vasodilatador en los vasos sanguíneos, efecto mediado vía receptor MT2, mientras que el efecto mediado por el receptor MT1 es vasoconstrictor,

aunque el mecanismo aún no está dilucidado por completo (Baker y cols, 2018).

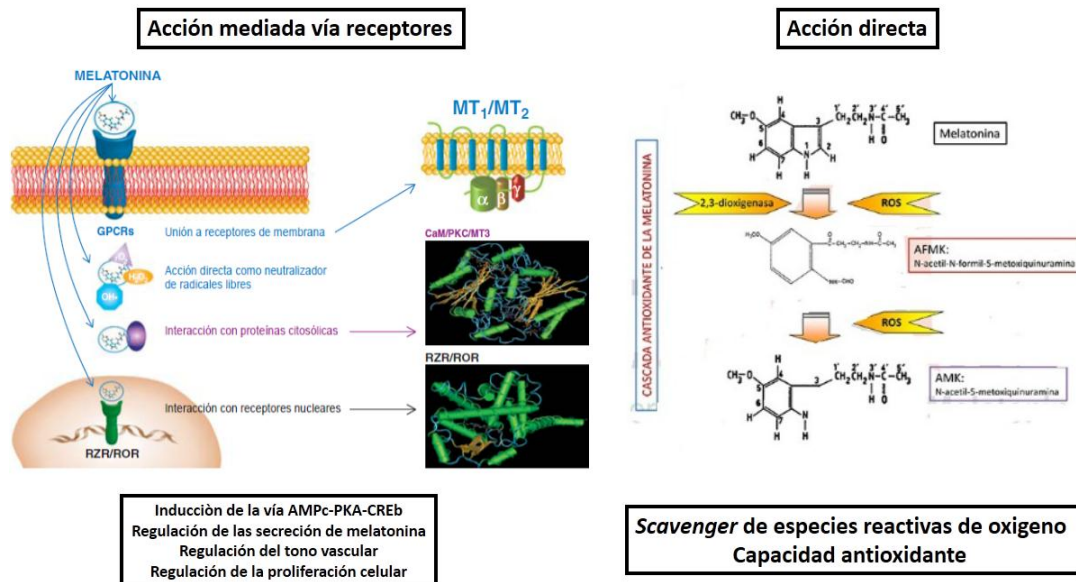


Figura 6. Vías de acción celular de melatonina. En el esquema está representado la acción mediada vía receptor de membrana plasmática (GPCR) y nuclear (figura de la izquierda) de melatonina. Por otro lado, está representado la acción *scavenger* de melatonina (figura de la derecha) por la cual es capaz de neutralizar y eliminar especies reactivas de oxígeno, (continuación) disminuyendo el estrés oxidativo a nivel celular (adaptado de Dubocovich y cols, 2005).

Por otro lado, las primeras pruebas de la existencia de receptores nucleares de melatonina se conocieron tras aislar melatonina en el núcleo celular, planteando la hipótesis de que esta podría estar regulando la expresión génica. Posteriormente, se demostró la acción genómica de melatonina a través de los receptores nucleares de tipo ROR α (Lardone y cols, 2011). La estructura de la familia de receptores ROR poseen un dominio de unión al DNA (DBD) altamente conservado, un dominio bisagra y un dominio a unión a ligando (LBD) (Jetten y cols, 2001), siendo esta una de las pruebas por las cuales melatonina, a través de ROR α , inhibe a la enzima 5-lipooxigenasa,

responsable de la síntesis de leucotrienos pro inflamatorios en los linfocitos B humanos (Steinhilber y cols, 1995).

Finalmente, dentro de las acciones directas de melatonina, destaca su capacidad de *scavenger* de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Melatonina es capaz de interactuar con el radical hidroxilo (OH●) (Tan y cols, 1993) y oxígeno singlete (Cagnoli y cols, 1995). También puede depurar peróxido de hidrógeno (Tan y cols, 2000) y el radical $\bullet\text{O}_2^-$ (Zang y cols, 1998). Cuando la molécula de melatonina interactúa con OH●, le cede un electrón y se origina el radical indolil, este puede reaccionar con otra molécula de OH● y producir 3-hidroximelatonina cíclica, eliminando dos moléculas de radical OH●, o puede reaccionar con una molécula de $\bullet\text{O}_2^-$ y formar AFMK, el cual se elimina a través de la orina depurando ROS del organismo (Reiter y cols, 2001).

Adicionalmente, la melatonina ha demostrado que puede actuar como antioxidante indirecto, ya que es capaz de activar diversos sistemas antioxidantes celulares, como la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) (Acuña-Castroviejo y cols, 2001). Además, estimula la expresión de la enzima gama-glutamilcisteina sintasa (Urata y cols, 1999), aumentando la generación de glutatión a nivel celular. Por último, se ha descrito que la melatonina estimula la eficiencia de otros antioxidantes naturales, ya que el grupo N-acetil posee acción sinérgica con las vitaminas C y E (Reiter y cols, 2003). Todos los mecanismos mencionados anteriormente, nos hacen proponer a

melatonina en esta Tesis como agente terapéutico, con la finalidad de disminuir el estrés oxidativo y favorecer la vasodilatación a nivel pulmonar.

6. Estrategia Antirremodelante para tratar la Hipertensión Pulmonar Neonatal: Utilización de Hemina.

6.1. El monóxido de carbono a nivel vascular

El monóxido de carbono (CO) químicamente es un gas diatómico. Su acción vasodilatadora fue descrita por primera vez en arterias coronarias de ratas, y actualmente se sabe que esta vasodilatación por CO está presente en diferentes territorios vasculares (McGrath, 1984). En término de sus propiedades fisicoquímicas, comparte algunas con el óxido nítrico (NO), como la masa molecular y solubilidad. Además, al igual que el NO, tiene la capacidad de unirse al átomo de fierro de la fracción hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs), activando a la enzima y aumentando la producción de GMPc intracelular (Brune y cols, 1990). A pesar de que la potencia de activación del CO es menor a la del NO, se ha demostrado un mecanismo biofísico que sensibiliza a la GCs al CO endógeno (Friebe y cols, 1996). Por otro lado, existen diferencias bioquímicas significativas entre estos dos gases. A diferencia del radical NO, el CO es un gas estable y no se somete a los diversos oxidantes y reacciones reductivas características del NO (Lipton y cols, 1993). De esta manera, mientras que el NO se une tanto a las hemoproteínas ferrosas como a las férricas, el CO solo se une al hemo ferroso (Wang y cols, 1994). Por lo tanto, el CO puede funcionar como una molécula de señalización más estable y selectiva.

La fuente biológica predominante de CO proviene de la degradación del grupo hemo por la enzima hemooxigenasa (HO). Cantidades menores de CO también se generan a partir de la oxidación de moléculas orgánicas y de la peroxidación lipídica (Rodgers y cols, 1994). El sistema hemooxigenasa fue descubierto originalmente como un sistema de proteínas con actividad enzimática dependiente de NADPH presente en preparaciones de membrana microsomal hepática, responsable de la degradación del grupo hemo (Tenhunen y cols, 1989). Las HO catalizan la degradación región específica del grupo hemo *b* (ion protoporfirinico IX) en CO, ion ferroso y biliverdina IXa. Subsecuentemente, la biliverdina IXa es convertida en bilirrubina por la enzima bilirrubina reductasa a nivel extracelular (Noguchi y cols, 1979). En términos del mecanismo de acción, el ion férrico del grupo hemo *b* es reducido por electrones provenientes del NADPH (cofactor de la enzima), el oxígeno molecular se une al sitio catalítico de la enzima como un intermediario oxidoferroso, el cual capta electrones del NADPH para formar el intermediario hidroperóxido férrico (Yoshida y cols, 1974). Este intermediario hidroxila al puente de carbono α -metino del anillo del grupo hemo formando el intermediario hidroxihemo. El puente de carbono α -metino es eliminado en forma de CO generando la producción secuencial de verdohemo y ferribiliverdina IXa. Finalmente, la ferribiliverdina IXa es reducida generando la liberación del ion ferroso y de biliverdina IXa. En conclusión, el sistema de las hemooxigenasas usa el grupo hemo como grupo prostético y sustrato (Sakamoto y cols, 1999).

Se han descrito tres isoformas del complejo hemoxygenasa (HO). La hemoxygenasa 1 (HO-1), la cual esta codificada por el gen *hmx1*, la hemoxygenasa 2 (HO-2), codificada por el gen *hmx2* y la hemoxygenasa 3 (HO-3), codificada por el gen *hmx3*. Aunque esta última posee una alta similitud en la secuencia aminoacídica con HO-2, permanece parcialmente caracterizada. Sin embargo, HO-3 no tiene actividad enzimática significativa y no ha sido descrita en el territorio vascular (McCoubrey y cols, 1997). *Hmx1* y *Hmx2* son genes parálogos, mostrando un 43% de similitud de su secuencia aminoacídica. Ambas proteínas poseen idéntica similitud en la región de 24 aminoácidos conocida como la unión al grupo hemo (residuo histidina imidazólico, His-25 en HO-1 y His-45 en HO-2), el cual actúa como ligando al grupo hemo (Ishikawa y cols, 1998). Con respecto a la ubicación subcelular de estas proteínas, en una primera instancia se les caracterizó como proteínas asociadas a retículo endoplasmático (fracción microsomal), sin embargo, ambas isoformas contienen una región *carboxi* terminal hidrofóbica conservada, la cual actúa como dominio de anclaje para la unión a membrana plasmática (McCoubrey y cols, 1993). De hecho, HO-1 se encuentra asociada a caveolas en células endoteliales (Kim y cols, 2004) o a su posible compartimentalización a nivel nuclear en células NIH3T3 inducidas por LPS (Nguyen y cols, 2002). Además, ambas enzimas se encuentran tanto en endotelio como en células musculares lisas de venas y arterias (Ayer A y cols, 2016).

6.2 Sistema HO-CO

Hemooxigenasa 1

La primera isoforma del complejo hemooxigenasa en ser identificada se denominó hemooxigenasa-1 (HO-1), que inicialmente se reconoció como una proteína de choque térmico, con un peso molecular de 32 kDa (Maines y cols, 2005). En condiciones fisiológicas, la expresión de esta enzima sólo ocurre en el bazo y en la mayoría de las células es muy baja. Sin embargo, su expresión se ha detectado en el cerebro, en poblaciones neuronales del cerebelo, tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral y en el endotelio cerebral (Bergeron y cols, 1998). La expresión de la HO-1 se induce principalmente como respuesta a su sustrato, el grupo hemo, pero también por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran: metales, radiación ultravioleta, hipoxia, hiperoxia, isquemia, H₂O₂ y depleción de glutatión, entre otros (Orozco-Ibarra y Pedraza-Chaverri, 2008). Estos estímulos extracelulares, inducen la estabilización de diferentes factores transcripcionales como AP-1, AP-2, NF-kB o Nrf2 (Alam y Cook, 2007).

Hemooxigenasa 2

La isoforma de la hemooxigenasa 2 (HO- 2) posee un peso molecular de 36 KDa. A pesar de que su expresión constitutiva se ha detectado predominantemente en el territorio vascular y en tejido cerebral, se ha evidenciado su inducción por corticosteroides (Maines y cols, 1996). Recientemente, se ha descrito un mecanismo por el cual cambios en el estado redox celular de la proteína logran modificar el sitio de unión al grupo hemo

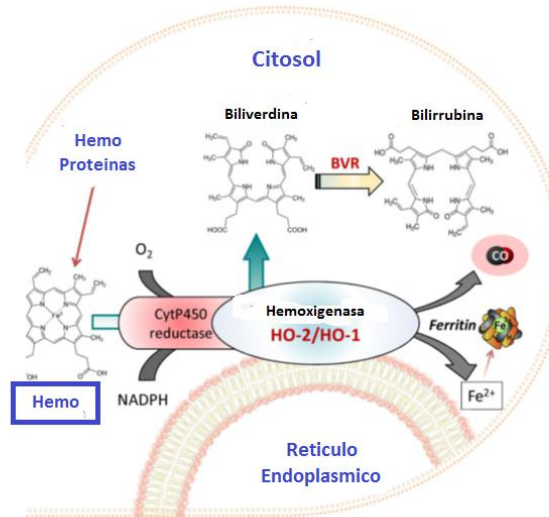
(motivo cisteína-prolina), aumentando la afinidad de la enzima por su sustrato (Ragsdale, 2011). Esta regulación redox del sitio activo de la enzima estaría jugando un rol esencial, en el cual la HO-2 mediante la formación de CO y su modulación a los canales de potasio dependiente de Ca^{2+} de alta conductancia (BKCa) a nivel del cuerpo carotideo, regula el *sensing* de la presión parcial de oxígeno (Williams y cols, 2004).

6.3 Características terapéuticas del sistema HO-CO.

Se han descrito diferentes efectos positivos de la señalización intracelular del sistema HO-CO que podrían ser clínicamente aplicables, en particular las relacionadas a enfermedades cardiovasculares. Dentro de estas se enumeran: a) la actividad vasoactiva a través de la regulación del tono del músculo liso vascular (Piantadosi, 2002); b) efectos antiinflamatorios a través de la regulación de la expresión y liberación de diversas citoquinas (Ernst y Zibrak, 1998); c) reacción antiapoptótica mediante la inhibición de la vía apoptótica celular en las mitocondrias; d) y la regulación del ciclo celular inhibiendo la proliferación celular (Almeida y cols, 2015). Aunque el territorio cardiovascular podría ser la opción con mayor potencial para el uso terapéutico de CO, muchos mecanismos subyacentes a los efectos clínicos del CO en el tejido cardíaco aún deben ser caracterizados (Figura 7).

Sistema Hemoxigenasa

A. Catabolismos del grupo Heme



B. Efectores Celulares

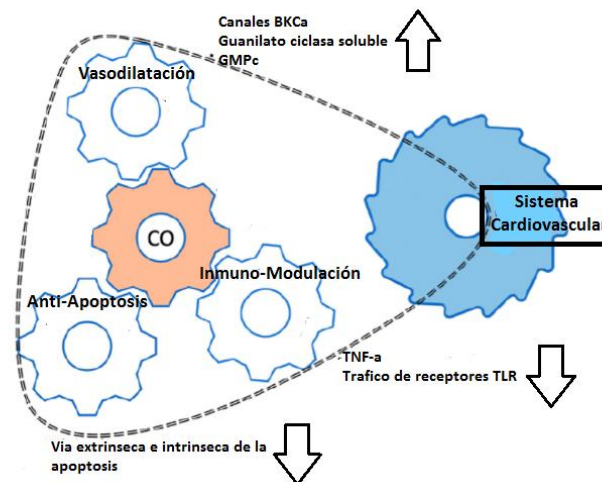


Figura 7. Sistema HO-CO y sus efectos cardiovasculares. Diagrama esquemático del catabolismo del CO mediado por el sistema hemooxigenasa (A) y los efectos del CO en el sistema cardiovascular (B). La posibilidad de acción sobre el sistema cardiovascular está representada por la línea de puntos. La flecha que apunta hacia arriba y la flecha que apunta hacia abajo significan activación e inhibición para cada vía, respectivamente. (Adaptado de Hyuk-Hoon Kim y cols, 2018).

El CO desempeña importantes funciones en la regulación del tono vascular, principalmente activando los canales BKCa y en parte activando la guanilil ciclasa soluble en las células del músculo liso vascular (Yuan y cols, 2010). Los canales BKCa pueden activarse o abrirse por medios dependientes de voltaje o por un aumento en la concentración de calcio a nivel celular, permitiendo que el potasio fluya hacia el exterior, regulando así la repolarización del potencial de membrana. El CO sensibiliza los canales BKCa y regula la actividad del canal en las células del músculo liso arterial para mantener los niveles intracelulares de Ca^{2+} dentro de la concentración micromolar (Brenner y cols, 2000). La sensibilización de estos canales generan continuas corrientes transitorias de K^{+} hacia el medio extracelular hiperpolarizando la membrana plasmática y reduciendo las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, lo que finalmente resulta en una respuesta de vasorrelajación en el vaso sanguíneo. Además del mecanismo descrito anteriormente, el CO puede activar a la GCs (aunque en menor medida que el NO), elevando el GMPc intracelular y activando a la proteína quinasa G dependiente de GMP (PKG). La PKG activada induce la recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (fosforilación inhibitoria de los canales de rianodina) y provoca la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la relajación del músculo liso (Koneru y cols, 2004).

Por otro lado, el CO participa en varios efectos antiinflamatorios por la supresión de la respuesta inmune. Uno de los posibles mecanismos es la supresión de la producción y la liberación de TNF- α en los macrófagos, tal como lo demuestran estudios en los que se induce una respuesta inflamatoria

por lipopolisacáridos (LPS) (Sawle y cols, 2005), mecanismo descrito dependiente de la citoquina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10). La IL-10 juega un papel importante en la reacción antiinflamatoria al inhibir la producción de TNF a través de la activación de la vía de señalización MAPK p38 (Lee y cols, 2002). El aumento de IL-10 liberado de los macrófagos en respuesta a la activación de CO promueve la expresión de la HO-1, que produce CO a partir de moléculas de hemo. Esto indica que CO e IL-10 forman un circuito de retroalimentación positiva que refuerza su potencial antiinflamatorio a través de regulación positiva de sus expresiones. Otros mecanismos que subyacen a los efectos antiinflamatorios de la CO implican la inhibición del tráfico y ensamblaje en membrana de los receptores tipo toll (TLR) en la membrana plasmática (Nakahira y cols, 2006). Los TLR se expresan en células de la inmunidad innata, como macrófagos y células dendríticas. El reconocimiento de moléculas derivadas de patógenos por los TLR activa las vías de señalización que inducen la expresión de genes proinflamatorios. El tráfico de los TLR a las balsas de lípidos en respuesta a patógenos depende de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El CO modula la vía de señalización de TLR mediante la inhibición de la translocación de TLR a balsas de lípidos mediante la supresión de la generación de ROS dependiente de la NADPH oxidasa (Akira y Takeda, 2004).

La acción antiapoptótica del CO se centra en la prevención de la asociación de Bid y Bax, que son miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 en la membrana mitocondrial externa. El CO inhibe la expresión y la translocación

mitocondrial de Bax (Wang y cols, 2007), y también evita la activación de Bid al inhibir la actividad de la caspasa-8 (Kantari y Walczak, 2011). El Bid activado es un inductor directo de Bax, que causa un cambio conformacional que permite la oligomerización e inserción de Bax en la membrana mitocondrial externa, facilitando la liberación del citocromo c y otras moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial (Terrones y cols, 2004). Por otro lado, se ha descrito que el CO regula la expresión de la ciclina D1, un regulador clave de la progresión de G1; además de regular la expresión de p21^{Cip1}, un potente inhibidor de la progresión del ciclo celular, a través de la vía MAPK de ERK1/2, que resulta en la detención de células en la fase G0/G1 del ciclo celular (Song y cols, 2002). A través de estos mecanismos, el CO podría exhibir un efecto antiproliferativo sobre las células musculares lisas ubicadas en el sistema vascular y en particular en el territorio vascular pulmonar.

6.4. Inducción del sistema HO-CO por hemina

La hemina es el nombre farmacológico para el grupo hemo, molécula derivada de la unión de la Protoporfirina IX con un átomo de Fe³⁺, resultando una variante de la hemoglobina incapaz de captar oxígeno. Sin embargo, esta molécula es capaz de unirse al sistema microsomal de la hemoxygenasa (Kikuchi y cols, 2005), la cual cataliza la reacción de ruptura y oxidación del puente α -meteno de la molécula de hemina para producir cantidades equimolares de CO, Fe²⁺ y biliverdina. Esta reacción de degradación de la hemina es esencialmente muy similar a la descomposición del grupo hemo

endógeno (Lad y cols, 2003), razón por la cual esta molécula se convierte en una alternativa farmacológica para el tratamiento de la HPN.

7. Tratamiento combinado antioxidante-antiremodelante.

La HPN es una condición compleja y multifactorial, por lo tanto, una terapia adecuada debe basarse en resolver los diferentes factores precursores de la enfermedad, como la baja oxigenación, la vasoconstricción activa, la generación excesiva de ROS y la intensa proliferación a nivel vascular pulmonar. Bajo esta base, se propone en esta tesis un tratamiento con melatonina (antioxidante y vasodilatador) y hemina (antiproliferativa, vasodilatador y antioxidante).

Se ha demostrado la eficacia de melatonina en la protección contra varios estados patológicos relacionados al estrés oxidativo, tales como la asfisia perinatal, sepsis neonatal, síndrome de dificultad respiratoria y la displasia broncopulmonar (Miller y cols, 2012; Gitto y cols, 2013). Más aun, en neonatos gestados en hipoxia crónica, un tratamiento posnatal de 10 días con melatonina ha demostrado ser efectivo en la disminución del estrés oxidativo por diversas vías (Torres y cols, 2015). A saber, melatonina no sólo tiene la capacidad de anular directamente a especies reactivas de oxígeno (ROS), sino que además modula positivamente la capacidad antioxidante enzimática a nivel plasmático y pulmonar (Torres y cols, 2015). Sin embargo, este tratamiento no logró reducir la PAP a largo plazo. La elección de melatonina como antioxidante se basa en sus fuertes propiedades antioxidantes, su capacidad vasodilatadora y la falta de efectos adversos (Miller y cols, 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que la administración de hemina durante 10 días a corderos recién nacidos bajo la condición de hipoxia crónica, se asocia a una reducción significativa en la resistencia vascular pulmonar y la presión sanguínea arterial pulmonar (Ebensperger, 2011). Además, este tratamiento disminuyó la presión arterial pulmonar y mejoró el crecimiento postnatal en los corderos recién nacidos en tierras altas (Llanos y cols, 2012), todos ellos efectos dependientes de la activación de la hemooxigenasa (HO) (Ebensperger y cols, 2010). Los mecanismos de estas respuestas al tratamiento de hemina incluyen un aumento en la función HO pulmonar, una función vasodilatadora mejorada, una mayor expresión de sGC y una reversión en la remodelación cardiopulmonar (Ebensperger, 2012; Riquelme, 2013). Por esta razón, se sugiere al efecto producido por hemina en la inducción del sistema HO como tratamiento alternativo para mejorar la condición de hipertensión pulmonar en los recién nacidos gestados bajo hipoxia crónica. Sin embargo, no se ha determinado si el efecto de hemina persiste en el tiempo luego de retirado el tratamiento. En este contexto, se determinó como objetivo de estudio de esta tesis la evaluación del efecto terapéutico de un tratamiento farmacológico combinado dirigido a HPN, utilizando por un lado, como agente antioxidante y vasodilatador pulmonar vascular a melatonina, y por otro, a hemina como agente antirremodelante y vasodilatador. Además, este estudio pretende descubrir si los potenciales efectos cardiopulmonares persisten en el tiempo una vez retirado el tratamiento en corderos mantenidos en hipoxia hipobárica crónica.

HIPOTESIS

La disfunción vascular, estrés oxidativo y remodelamiento vascular asociado a la hipertensión pulmonar producida por hipoxia crónica serán disminuidos por la administración de melatonina y hemina, lo que impactará en una mejor función vasodilatadora y caída de la presión arterial pulmonar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración de melatonina y hemina reducen la hipertensión arterial, mejoran la función vascular, disminuyen el estrés oxidativo y previenen el remodelamiento vascular pulmonar en neonatos de oveja con hipertensión pulmonar neonatal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este estudio se propuso determinar el efecto de melatonina y hemina en la respuesta cardiopulmonar en neonatos con hipertensión pulmonar gestados en hipoxia crónica, a través de los siguientes objetivos específicos:

- Determinar *in vivo* la función cardiopulmonar durante el tratamiento, mediante monitoreo cardiopulmonar continuo.
- Determinar *ex vivo* la función vascular pulmonar de arterias pequeñas de resistencia usando fármacos vasoactivos.
- Determinar *in vitro* la expresión y actividad de moléculas relacionadas con la función vasodilatadora y vasoconstrictora en tejido pulmonar.
- Determinar el nivel de estrés oxidativo en tejido pulmonar.
- Determinar la histo-morfometría, marcadores de proliferación y de remodelamiento de arterias de resistencia pulmonar.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los manejos animales y procedimientos experimentales propuestos en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre investigación en animales, CBA#0761 FMUCH, de la Universidad de Chile, y se llevaron a cabo según las normas internacionales establecidas en la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicada por la el “US National Institutes of Health” (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). De esta manera, y en base a los lineamientos establecidos por estas directrices, se utilizó la mínima cantidad de animales que se necesitan para lograr datos representativos (5-6 animales por grupo experimental).

Como modelo experimental se utilizaron ovejas recién nacidas con hipertensión pulmonar, modelo previamente caracterizado y establecido por el Laboratorio (Herrera y cols, 2007; Herrera y cols, 2008). Estos corderos fueron expuestos a hipoxia crónica de grandes altitudes (3600 msnm) desde la concepción, durante su gestación y en su vida postnatal (periodo de experimentación).

Los grupos experimentales se definieron de la siguiente manera (Figura 8):

- **Grupo Control (C):** En este grupo se incluyeron 5 corderos neonatos, sin tratamiento farmacológico, pero con la administración del vehículo correspondiente de melatonina y hemina por 20 días. Para el control de

melatonina se utilizó etanol al 1,4% por vía oral y para el control de hemina se utilizó NaOH 0,01N por vía subcutánea.

- **Grupo melatonina + hemina postnatal (MH):** En este grupo se incluyeron 5 corderos neonatos, que recibieron el siguiente esquema de tratamiento combinado:

Los primeros 10 días postnatales: melatonina oral ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) y hemina subcutánea ($10 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$). Los siguientes 10 días postnatales (desde el día 11 al 20) sólo se administró melatonina oral diaria ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

- **Grupo melatonina postnatal (M):** En este grupo se incluyeron 5 corderos neonatos, que recibieron tratamiento con melatonina oral diario, en dosis de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, desde el día 3 al 23 postnatal.
- **Grupo hemina postnatal (H):** En este grupo se incluyeron 3 corderos neonatos, que recibieron tratamiento con hemina subcutánea, en dosis de $10 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$, desde el día 3 al 13 postnatal.

Las dosis de melatonina fueron administradas a las 20:00 h y las de hemina a las 10:00 h. Todos los animales fueron monitorizados hasta los 28 días de edad. Al día 29, los 20 corderos se eutanisaron para obtener muestras de arterias pulmonares y tejido pulmonar.

Al tercer día postnatal y bajo anestesia general (ketamina 10 mg/kg + xilazina 0.04 mg/kg im), todos los animales fueron sometidos a una cirugía aséptica donde todos los corderos fueron instrumentados crónicamente con catéter:

Swan-Ganz (pulmonar), arterial y venoso centrales (aorta y cava). Los extremos distales de los catéteres se mantuvieron en un bolsillo unido a la piel. Durante el procedimiento quirúrgico se administró metamizol sódico (10 mg/kg sc) como tratamiento antiinflamatorio y analgésico post-quirúrgico. Los catéteres se mantuvieron permeables mediante suero heparinizado (100 UI/ml).

2. Registro *in vivo* de las variables cardiopulmonares.

Desde el día 3 al 28 postnatal, se registró la función cardiopulmonar *in vivo* a través de un registro discontinuo durante 30 min de las siguientes variables: Presión arterial pulmonar (PAP) y sistémica (PAS), gasto cardiaco (GC), frecuencia respiratoria (FR), resistencia vascular pulmonar (RVP) y sistémica (RVS) de los 4 grupos experimentales (Figura 8). Este protocolo permitió un monitoreo diario y preciso de los primeros 28 días de vida, evidenciando una descripción de la transición feto-neonatal y de la hipertensión pulmonar en neonatos nacidos bajo hipoxia crónica. Posteriormente, al día 29 postnatal, estos animales se eutanisaron por una sobredosis de tiopental sódico (OPET, 100 mg/kg ev lento) para la colección de tejidos y su posterior análisis *ex vivo* e *in vitro*.

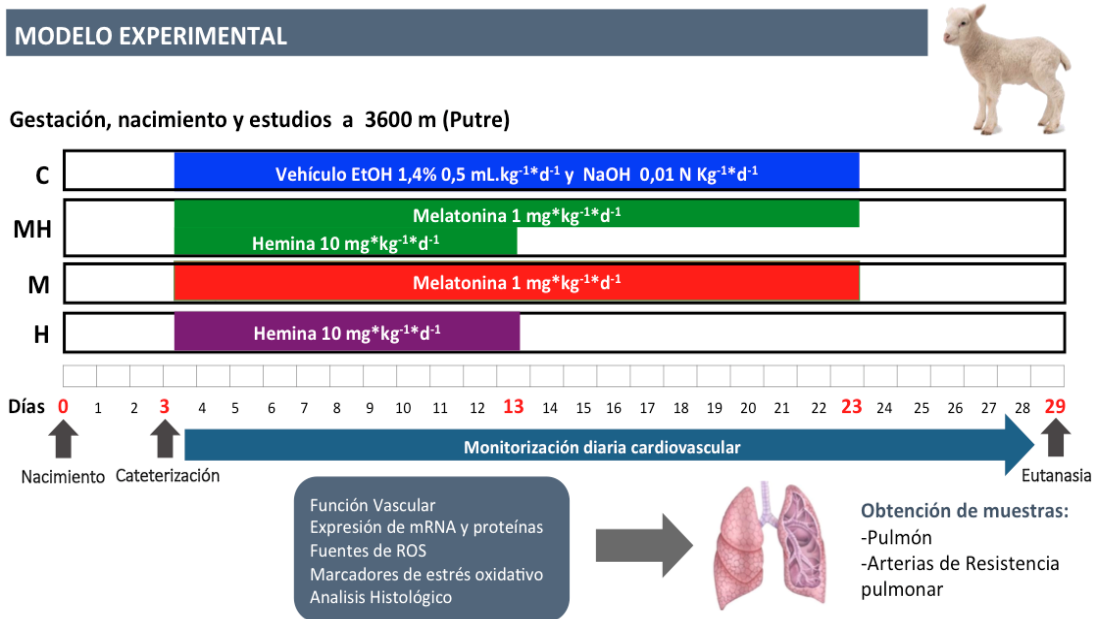


Figura 8. Esquema temporal del protocolo experimental en los neonatos de ovejas gestadas, nacidos y estudiados en tierras altas. Los tratamientos se administraron diariamente durante los días 3 al 23 postnatal. La terapia farmacológica fue la siguiente: grupo control (C, n=5), grupo melatonina (M, n=5), grupo hemina (H, n=3) y grupo melatonina-hemina (MH, n=5). Durante el día 29 se realizó la eutanasia y se recolectó tejido pulmonar para determinaciones de biología molecular y arterias de resistencia pulmonar para ensayos *ex vivo* de función vascular.

3. Ensayo *ex vivo* de la función vascular en arterias de resistencia pequeñas pulmonares.

Una vez disecado el pulmón derecho, se procedió a la extracción de arterias pulmonares pequeñas de 3^{er} y 4^{to} orden (2 mm de largo, 200-400 µm de diámetro interno), para luego ser cuidadosamente limpiadas y montadas en un miógrafo de alambre (DMT 620M, Danish Myo Technologies, Denmark). Los anillos vasculares fueron montados en el miógrafo con dos alambres de 40 µm de diámetro que fueron pasados por el lumen del vaso. Para determinar el diámetro interno de la arteria, se realizó una separación progresiva de

ambos alambres hasta que tocaran el endotelio vascular, determinando así su diámetro interno real en reposo. Durante todo el procedimiento de disección, montaje y experimentación, los anillos se mantuvieron en una solución fisiológica de Krebs (NaCl 118.5, KCl 4.75, MgSO₄•7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂ 2.5, glucosa 11.1 mmol.l⁻¹), burbujeados con 95% O₂ y 5% CO₂ a una temperatura de 39°C (equivalente a T^o fisiológica de los corderos). Transcurrido un periodo de 30 minutos de equilibrio bajo solución Krebs, los vasos fueron estirados para lograr una tensión de reposo equivalente a una presión transmural fisiológica (entre 20-25 mmHg según registros *in vivo*). Esto se realizó para simular las condiciones *in vivo* y mantener una tensión de reposo óptima ya que la respuesta vascular es dependiente del grado de tensión (Mulvany y Halpern, 1977; Herrera y cols, 2010).

Para evaluar la función vascular, las arterias se sometieron a curvas dosis-respuesta a diferentes concentraciones de fármacos vasoactivos. Brevemente se determinó la capacidad máxima contráctil arterial, administrando dosis crecientes de K⁺ (4,76 - 100,94 mM). La respuesta vasoconstrictora se evaluó a través de curvas de respuesta a concentración-acumulativa (CCR) a los agonistas: serotonina (5HT: 10⁻¹⁰ – 10⁻⁴ mol/L), un mimético de tromboxano (U46619: 10⁻¹³ – 10⁻⁵ mol/L) y endotelina-1 (ET-1: 10⁻¹⁰ – 10⁻⁴ mol/L). Para el registro de la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio, se realizó una pre-contracción de las arterias con una dosis única de serotonina 10⁻⁵ mol/L. Posterior a la estabilización de la contracción de las arterias, se

comenzó una CCR con un dador soluble de NO, nitroprusiato de sodio (SNP: $10^{-10} - 10^{-4}$ mol/L).

La respuesta vasodilatadora endotelio dependiente, también fue determinada previa pre-contracción con serotonina 10^{-5} mol/L, y se realizó una CCR a metacolina (MetCh: $10^{-10} - 10^{-4}$ mol/L), la cual es un agente muscarínico no hidrolizable. Para determinar los componentes óxido nítrico y prostanoide en la vasodilatación mediada por MetCh, se repitió la curva en presencia de un bloqueador de eNOS (L-NAME 10^{-5} mol/L) y de las ciclooxygenasas (Indometacina 10^{-6} mol/L) (Herrera y cols. 2010; Torres y cols, 2015).

4. Determinaciones *in vitro*

4.1. RT PCR semicuantitativo en tejido pulmonar.

Se preparó RNA total de acuerdo a protocolos previamente publicados (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para la síntesis de cDNA, se mezclaron 2 μ g de RNA total con 50 ng de partidores tipo Random hexamers (stock a 50 ng/ μ L), y un mix de dNTPs (stock a 10 mM) y se denaturaron a 70 °C x 5 min en un termociclador para prevenir la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa por adición de un medio de reacción: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 40 unidades del inhibidor de RNasa y 50 unidades de transcriptasa reversa (RevertAidMR H Minus M-MuLV RT, Molone Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase, Fermentas, Canadá), en un volumen final de 20 μ L. Se incubó por 10 minutos a 25 °C para provocar el apareamiento, luego por

50 minutos a 42 °C para la síntesis del cDNA y finalmente por 15 minutos a 70 °C para detener la reacción.

Tabla 1. Partidores y protocolos de PCR. Partidores diseñados y enviados a sintetizar usados en RT-PCR. La tabla muestra las temperaturas teóricas de alineamiento, la cantidad de ciclos y el tamaño de producto esperado.

mRNA	Nombre partidor	Secuencia	Tm °C	Numero de ciclos	Tamaño producto
5HT 2A	5HT 2AOvF1	5' CTCAGAAAATCGAACCAACC 3'	51,4	33	208
	5HT 2AOvR1	5' AGAAAAGGCGTCCACCAGG 3'	54,9		
5HT 2B	5HT 2BOvF1	5' GCGACTGACATCAGGAAA3'	54,5	31	171
	5HT 2BOvR1	5' GCATCCCAAAATGTCTTGT 3'	53,5		
5HT 1B/D	5HT 1B/DOvF1	5' TGTGGGTCTTCTCCATCTGC 3'	56,6	33	220
	5HT 1B/DOvR1	5' GTTCTGTGGGCGTCTGTTT3'	55,9		
5HTT	5HTTOvF1	5' ATGGCTGAGATGAGGAAG 3'	55,4	35	131
	5HTTOvR1	5' AGGAAGAAGACGATGGCAAA 3'	54,2		
ETa	ETAOvF1	5' GTGGAATGGTGGGAAT 3'	54,9	31	196
	ETAOvR1	5' AGAGGAAAACGACAAAGTCA 3'	54,6		
ETb	ETBOvF1	5' TCATCGGAACTCCACGC 3'	55,1	33	176
	ETBOvR1	5' ACACATCTCAACCCAAAGG 3'	55,1		
COX 1	CX1OvF1	5' CTCATCGGGGAGACCA TCAA 3'	60.2	35	276
	CX1OvR1	5' AGAAAAGGCGTCCACCAGG 3'	59.8		
COX 2	CX2OvF1	5' CAGAAATGGGCGATGAGC 3'	57.7	35	204
	CX2OvR1	5' GATGCCAGTGGTAGAGCGTG 3'	58.1		
eNOS	eNOSovF1	5"TTGGCTGGTAGCGGAAGG3"	59,2	31	202
	eNOSovR1	5"TCAGCTCGCCAAGGTGACCAT 3"	58,2		
Txs	TxsOvF1	5' CGGATTTGCCCAATAAGA3'	57,3	33	192
	TXsOvR1	5' AAAGACCTGACGGACGATG 3'	58,1		
Tp	TpOvF1	5' GCGAGGTGGAGATGATGGT 3'	59,3	33	257
	TpOvR1	5' GCTCAGGCGAGGGTAGAAG 3'	58,5		
PGI2s	I2sOvF3	5' GGCTGGAGAGTTACCTGCTG 3'	57.2	31	217
	I2sOvR3	5' ATCTGTGAAATGGGCTGCTC 3'	57.3		
IP	IPOvF7	5' GGTGACCACCTGATTCTGC 3'	57.3	33	192
	IPOvR7I	5' ACGGACTTTCGGAAGAGGAT 3'	57.9		
18s	18sF1	5' GTAAACCGTTGAACCCATT 3'	58.7	18	152
	18sR1	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'	58.2		

La amplificación de secuencias parciales de cDNA de 5HT 2A, 5HT2B, 5HT1B/D, 5HTT, ETa, ETb, COX 1, COX2, eNOS, Txs, Tp, PGI2S, Ip y 18SrRNA se realizaron a partir de una alícuota de cDNA procedente de 0,2 ug de RNA total, con 1 unidad de Taq polimerasa (Promega, USA) en 10 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 % Tritón X-100, 2 mM MgCl₂ y 1,5 mM MgCl₂

para 18SrRNA, 200 uM dNTP y 0,1 uM de cada uno de los partidores (Tabla 1). Para todas las reacciones, se realizaron ensayos preliminares para determinar el número de ciclos de PCR hasta la saturación. Los experimentos definitivos fueron realizados con el número de ciclos establecidos en la estandarización del ensayo (Tabla 1).

Los productos de reacción de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % p/v con RED GEL en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE). Las señales se visualizaron por transiluminación con luz UV, se digitalizaron con un sistema de foto adquisición (Kodak DC-120 equipado con software Kodak Digital Science 1D versión 2.03) y la intensidad se cuantificó por densitometría con el software Scion Image (Scion Image Beta 4.02; Scion Corporation, EE.UU.). Los resultados fueron normalizados contra expresión de transcrito para 18S y se expresaron como unidades arbitrarias (razón).

4.2 Expresión de proteínas en tejido pulmonar.

La extracción de proteína se realizó a partir de tejido pulmonar mediante homogenización mecánica en buffer RIPA (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 0,8%, Desoxicolato 0,8%, Leupeptina 0,002 mM, Pepstatina 0,001 mM, Floruro de Sodio 1 mM, PMSF 1 mM, Na₃VO₄, 1 mM), donde por cada 250 mg de tejido se agregó 1,2 mL del buffer. Posteriormente, se homogenizó y se centrifugó por 10 minutos a 6.000 g a 4°C, con la finalidad de obtener el sobrenadante (proteínas totales). La concentración de proteínas en el homogenizado se cuantificó por método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm.

Los lisados de proteína (1-40 µg según proteína), fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes SDS-PAGE (4% de gel concentrador y 10% de gel de corrida al 10%) (SDS-PAGE). Las condiciones de corrida fueron preparadas de acuerdo a los anticuerpos que se utilizaron y los protocolos ya establecidos. La electroforesis se realizó en una cámara (BioRad Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU.), realizándose a un amperaje constante de 50 mA por 2 horas aproximadamente. Luego, se realizó la transferencia de las proteínas separadas anteriormente a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, Germany) a un voltaje constante de 50 V por 2 h. Las membranas de nitrocelulosa ya transferidas, fueron bloqueadas con leche semidescremada al 4% p/v en PBS 1X durante 1 h y posteriormente fueron incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios comerciales específicos para cada proteína estudiada, la tabla de anticuerpos utilizada se resume en la tabla 2. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces en PBS 1X + Tween 20 al 25%, cada uno por 10 minutos, para posteriormente incubarlas por 1 h en PBS Tween 0,1%/ leche 0,4% conteniendo un anticuerpo secundario Thermo Scientific Pierce [Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody / Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (1:5000)] dependiendo del hospedero, conjugado con HRP. Nuevamente se efectuaron 3 lavados por 10 minutos cada uno, para luego incubar por 5 minutos con una mezcla de 4 mL de Super Signal West Pico (2mL de SuperSignal West Pico Stable Peroxide + 2 mL Super Signal West Pico Luminol/Enhancer). Finalmente, las membranas fueron montadas en una cámara reveladora Li-

Cor C-Digit Modelo 3600, y se cuantificó la expresión proteica por densitometría clásica utilizando el software Image Studio V.3.1. Las densidades de las señales fueron expresadas como razón de β -actina para normalizar por carga.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y condiciones de Western Blot

Anticuerpo	Peso (Kda)	Fabricante	Número de catalogo	Concentración	Hospedero
COX-1	70	Cayman chemical	160108	1;1000	Ratón
COX-2	70	Cayman chemical	160116	1;1000	Ratón
eNOS	140	BD transduction lab	610296	1;1000	Ratón
TXs	56	Cayman chemical	160715	1;3000	Ratón
Tp	42	Cayman chemical	101882	1;500	Ratón
PGIs	56	Cayman chemical	160640	1;1000	Conejo
IP	42	Cayman chemical	sc-365268	1;1000	Ratón
GCs	95	Santa Cruz	514183	1;3000	Ratón
PKG	75	Enzo life Sciences	ADI-KAP-PK005	1;1000	Conejo
HO-1	32	Thermo Fisher	Ma1-112	1;1000	Ratón
HO-2	36	Abcam	ab90515	1;2000	Conejo
BKCa	100	Abcam	abS6147	1;500	Conejo
p47phox	47	Thermo Fisher	SA387619	1;1000	Conejo
P-p47phox	47	LSBio	LS-C381612	1;1000	Conejo
Nitrotirosina	85	Merck Millipore	1A6	1;1000	Ratón
4-HNE	70	Abcam	ab46545	1;1000	Ratón
β actina	42	Thermo Fisher	AC-15	1;5000	Ratón

4.3. Determinaciones colorimétricas en tejido pulmonar.

Como marcador de lipoperoxidación, se realizó el análisis de 8-isoprostanos (8-iso Prostaglandin F₂ α) en tejido pulmonar utilizando un kit comercial colorimétrico (8-Isoprostane EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, USA, 516351). La preparación del tejido se realizó según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se homogenizó mecánicamente 100 mg de muestra en 1 mL de buffer de lisis (0,1 M de fosfato, pH 7,4, 1 mM de EDTA y 0,005 %

BHT). Luego, se centrifugó a 8.000 x g por 10 minutos y se tomaron 50 μ L del sobrenadante para realizar el ensayo, paralelamente se tomó 10 μ L para realizar la normalización de la muestra por medición proteica a través del ensayo de Bradford descrito previamente. El ensayo se basa en la competición entre 8-isoprostanos y una 8-isoprostano acetilcolinesterasa (AChE) conjugada (8-isprostane Tracer) con sitios de unión fijos para un anticuerpo sérico específico de 8-isoprostanos. Como la concentración del trazador (tracer) se mantiene constante mientras la de 8-isoprostanos de la muestra varía, la cantidad de trazador unida al anticuerpo sérico será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostanos en la placa de medición. El producto de la reacción enzimática se midió a 412 nm espectrofotométricamente. El análisis se realizó en primer lugar graficando la absorbancia en función de la concentración de 8-isoprostanos de cada estándar (función semi-logarítmica). El cálculo de la concentración de 8-isoprostanos de cada muestra se realizó interpolando la absorbancia medida en la ecuación linealizada de la curva estándar realizada anteriormente.

La cuantificación de la actividad de la xantina oxidasa (XO) en tejido pulmonar se realizó utilizando un kit comercial de ensayo de XO (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante, el tejido pulmonar se homogeneizó mecánicamente con 4 volúmenes de tampón de ensayo (assay buffer ®), posteriormente, la muestra se centrifugó a 16.000 x g durante 10 min y se aisló el sobrenadante. A continuación, se añadió la sonda (OxiRED™) a los sobrenadantes aislados previamente y se incubaron a 37 °C por 1 h. Finalmente, el producto de la reacción se cuantificó a una

absorbancia de 570 nm (Kit de ensayo de XO, ab102522, Abcam, MA, EE.UU.). El procesamiento de los datos se realizó interpolando los datos en una representación lineal de la concentración de H₂O₂ (nmol) (curva estándar) en función de la absorbancia (nn) utilizando la siguiente ecuación.

$$XO_{\text{actividad}} = XO \frac{B \times \text{factor de dilucion}}{(T2 - T1) \times V} = \text{nmol/min/ml}$$

Donde:

- B = a la cantidad de H₂O₂ (nmol) generada por la XO de la curva estándar.
- T1 = es el tiempo de la primera medición de las diferentes muestras analizadas.
- T2 = es el tiempo de la segunda medición de las diferentes muestras.
- V = volumen de la reacción.
- XO = es definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de la xantina produciendo 1 μmol de ácido úrico y H₂O₂ por minuto a 25°C.

La actividad de las enzimas antioxidantes fue medida en homogeneizado de tejido pulmonar total, se midió utilizando el kit de actividad de superóxido dismutasa (KOD) (K335-100, Biovision), el kit de actividad de catalasa OxiSelect (STA-341, Cell Biolabs, Inc.) y el kit de ensayo de Glutación peroxidasa (703102, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), según las directrices del fabricante. Se utilizó la concentración de proteína total de cada

muestra, con el propósito de la estandarización como se describió anteriormente (Torres, 2015).

5. Analisis histomorfométrico en tejido pulmonar.

El pulmón izquierdo se perfundió con solución salina para eliminar la sangre de los vasos y se fijó con 4% de paraformaldehído, sosteniendo una presión de perfusión de acuerdo con el promedio de la presión arterial pulmonar ~25 mmHg (registrada *in vivo* en los monitoreos diarios). De la muestra fijada, se obtuvieron trozos de 1 cm³ de parénquima pulmonar, la que se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm de espesor. Luego, fueron teñidas con tinción de van Gieson y se determinaron los diámetros externos e interno (lumen); los grosores de la túnica íntima, túnica media y túnica adventicia; y superficie vascular y densidad celular en las arterias pequeñas del parénquima pulmonar. Por cada animal, se analizaron al menos 25 arterias pequeñas de resistencia dentro del corte histológico.

La proliferación en la túnica media fue evaluada por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Ki67 (MAB3242, Millipore, Merck). Para esto, las muestras de parénquima pulmonar incluidas en parafina, se incubaron con el tampón de recuperación antigénica (Target Retrieval Solution, Dako) a 120 °C durante 25 minutos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-Ki67 disuelto en albúmina de suero bovino al 1% (1: 100) durante 3 horas, luego, los portaobjetos se incubaron con un polímero anti-ratón (EnVision System-HRP, Dako) durante 1 hora extra. Finalmente, la reacción inmunológica se reveló mediante

diaminobencidina y la tinción nuclear se realizó con hematoxilina Harris. Se fotografiaron de veinte a veinticinco arterias pulmonares de resistencia representativas (50 a 200 μm de diámetro interno) de cada animal y se determinó el porcentaje de células proliferativas contando las células positivas y totales por campo) como indicador de la remodelación de la pared vascular.

6. Medición de las variables farmacocinéticas asociadas a la administración de la terapia combinada.

Para estas variables, se obtuvieron muestras de sangre a través del catéter venoso central. Antes de proceder a la administración de melatonina y de hemina, se obtuvo una muestra que corresponde a la concentración basal de melatonina o ion ferroso como indicador de la inducción del sistema hemoxigenasa inducido por la administración de hemina. Los tiempos de toma de muestras de sangre en relación a la administración del fármaco fueron las siguientes: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 min para la cinética de melatonina, y de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 24 horas para la cinética de ion ferroso (hemina). Inmediatamente obtenidas las muestras, se realizó el fraccionamiento de la sangre a 5.000 x g durante 5 min, y las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C. La determinación cuantitativa de las concentraciones de melatonina en plasma se realizó por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Melatonin ELISA KIT, ENZO cat# ENZ-KIT150-0001) y de ion ferroso a través del método fotocolorimétrico a una longitud de 530 nm (método DPD).

7. Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los datos se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico de las mediciones fisiológicas (registro continuo) se realizó mediante un ajuste lineal de cada variable y un posterior análisis de correlación, a través del coeficiente de correlación de Pearson. Los análisis *in vivo* e *in vitro* como: mediciones puntuales de variables *in vivo* (cardiopulmonares y sistémicas), miografías, biología molecular, bioquímicos y de histología fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de un test de Dunnet como prueba post hoc (Prism 6.0, GraphPad). La significación estadística se estableció cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Objetivo Específico I. Determinar *in vivo* la función cardiopulmonar durante el tratamiento, mediante monitoreo cardiopulmonar diario.

Variables Hemodinámicas

El análisis previo al tratamiento de los valores de presión arterial pulmonar media (PAPm), resistencia vascular pulmonar (RVP), gasto cardíaco (GC), frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistémica (PAS) y resistencia vascular sistémica (RVS) realizada el día 3 postnatal, no mostró diferencias entre grupos (Figuras 9, 11, 13, 15, 17 y 19).

El comportamiento de la variable PAPm en función de los días tratados mostró una correlación negativa en los grupos analizados, excepto en el grupo tratado con hemina donde no se observó correlación (Figura 9 A y B). Además, el ajuste de la PAPm en una regresión lineal en función del tiempo y su pendiente no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 9C). Finalmente se realizó un análisis puntual durante el tratamiento en los días postnatales 5, 10, 21 y 28. Este análisis reveló que el grupo M disminuyó significativamente la PAPm al día 5 postnatal en comparación al grupo C. El resto de los grupos no presentó diferencias significativas en la PAPm en estos días (Figura 10). La RVP se mantuvo relativamente constante en todos los grupos analizados en función de los días postnatales (Figura 11A). El ajuste de la RVP en función del tiempo muestra una correlación significativa en todos los grupos (Figura 11B), siendo el grupo tratado con H el único que mostró un aumento significativo de la RVP (Figura 11C). Finalmente, en el análisis

puntual de las mediciones, solamente el día 21 postnatal existió un aumento significativo de la RVP del grupo tratado con H en comparación al grupo C, mientras que los otros grupos presentaron RVP constante durante el periodo experimental (Figura 12).

Las mediciones *in vivo* del GC mostraron una disminución de esta variable en función de los días postnatales en todos los grupos (13A), con disminuciones similares en todos los grupos (Figura 13B, C). Al análisis por días postnatales, el grupo M disminuyó de manera significativa el GC los días 5 y 21 postnatales en comparación al grupo C. Además, el grupo H logró disminuir de manera significativa el GC los días 5, 10 y 21 analizados en comparación al grupo C (Figura 14). Similar al GC, todos los grupos experimentales mostraron una disminución de la FC en función de los días postnatales (Figura 15A, B). Sin embargo, el grupo M mostró una disminución significativa en comparación al grupo C por día como lo demuestra la tasa de cambio (Figura 15C). Finalmente, al análisis de los días puntuales, se observó una disminución significativa de la FC del grupo M el día 5 en comparación al grupo C, mientras que los grupos H y MH no mostraron diferencias a lo largo del periodo experimental (Figura 16).

El registro de la PAS mostró un aumento de esta variable dependiente del tiempo en todos los grupos analizados (Figura 17), evidenciando una correlación significativa en todos los grupos experimentales excepto en MH (Figura 17B). De hecho, la tasa del cambio (pendiente) fue significativamente menor en MH, en comparación con C (Figura 17C). A pesar de la correlación

positiva, y debido a una pequeña pendiente, no se observó ningún cambio en el análisis puntual de la PAS entre los grupos analizados (Figura 18). Al igual que la PAS, la RVS aumentó en todos los grupos analizados en función de los días postnatales (Figura 19A) y el análisis de su correlación (Figura 19B). Sin embargo los grupos tratados MH y H mostraron un aumento significativo de la RVS por día en comparación al grupo C (Figura 19C). En contraste, no se observaron cambios en la RVS analizados en los días puntuales y entre grupos (Figura 20).

Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

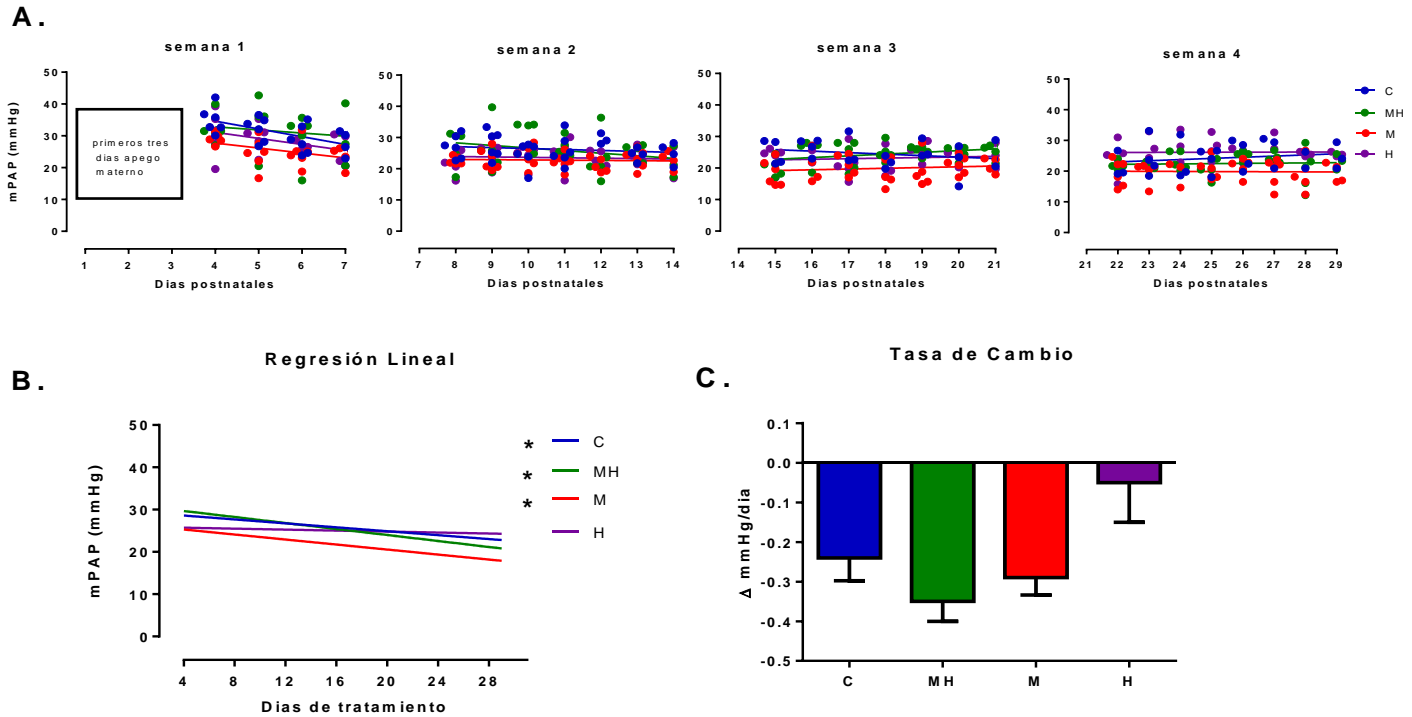


Figura 9. Presión arterial pulmonar I. Presión arterial pulmonar medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo de la presión pulmonar arterial media PAPm, B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

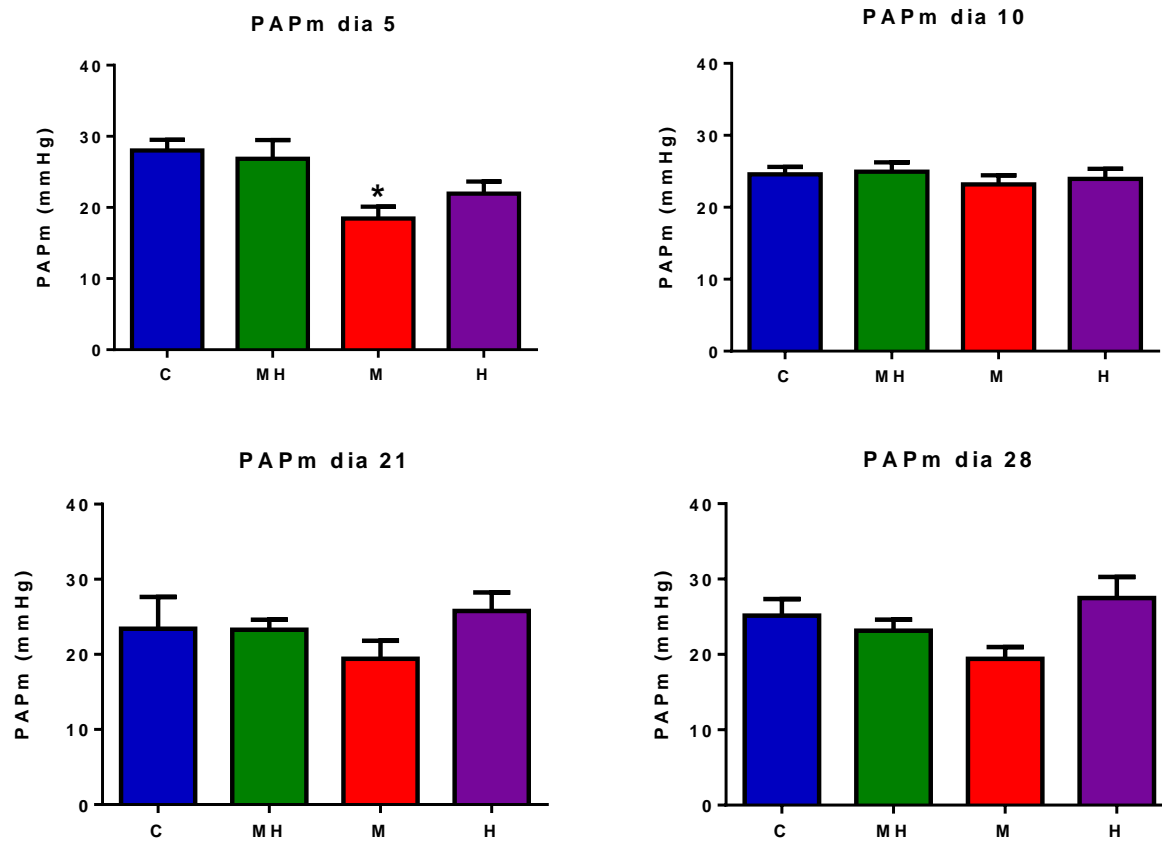


Figura 10. Presión arterial pulmonar II. Análisis de la variable PAPm durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

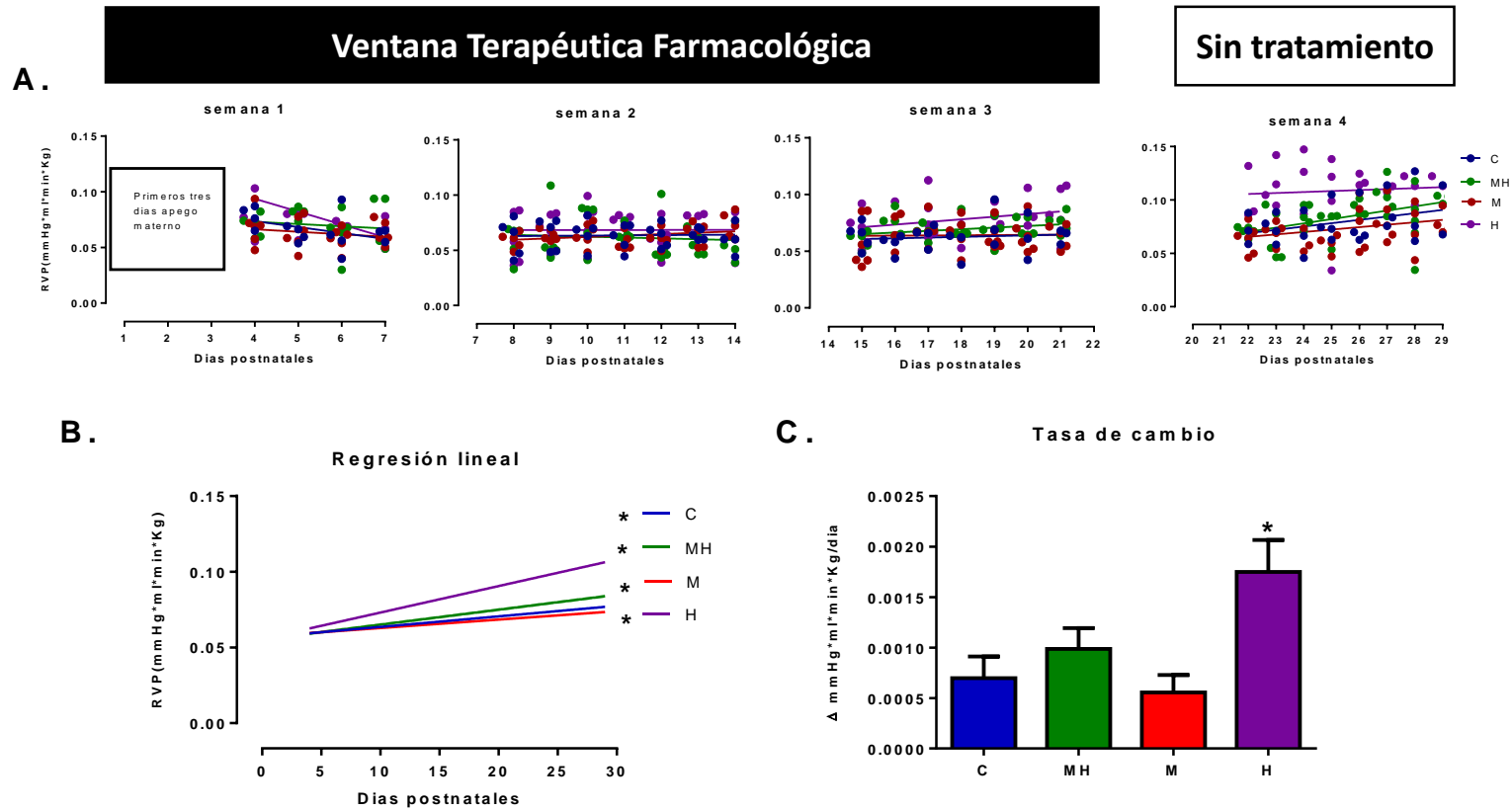


Figura 11. Resistencia vascular pulmonar I. Resistencia vascular pulmonar medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo de la resistencia vascular pulmonar (RVP), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

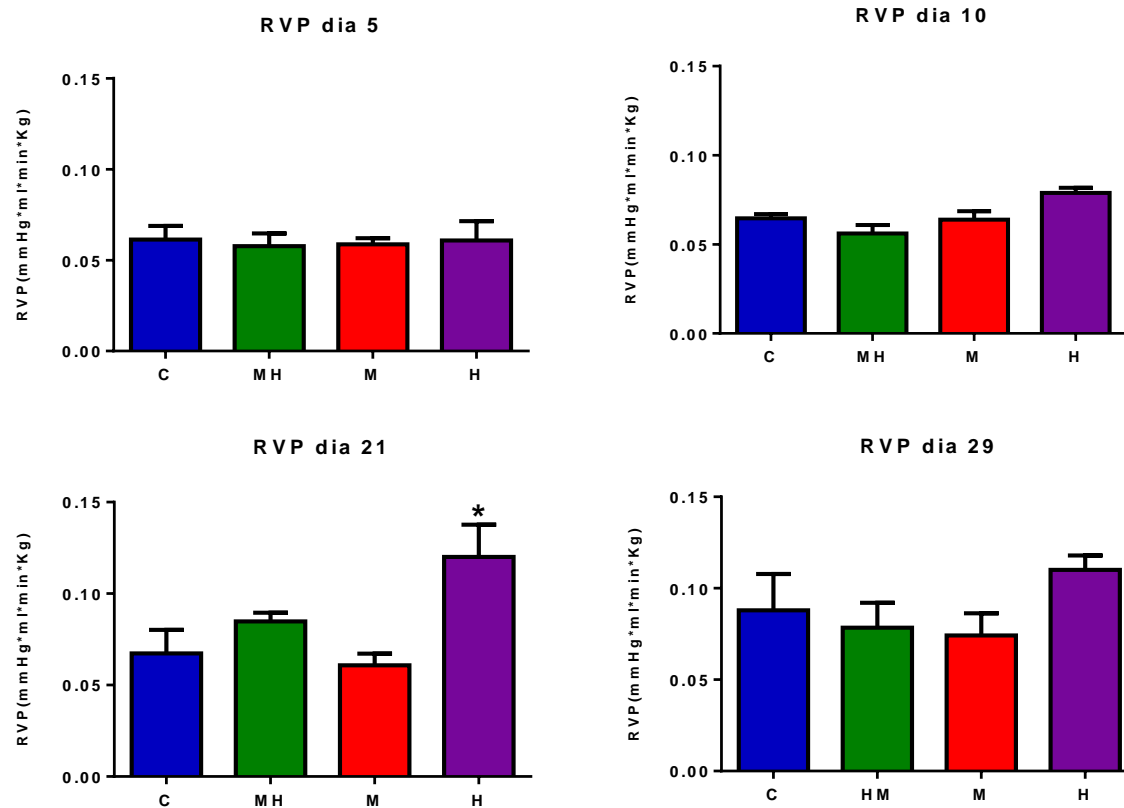


Figura 12. Resistencia vascular pulmonar II. Análisis de la variable RVP durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

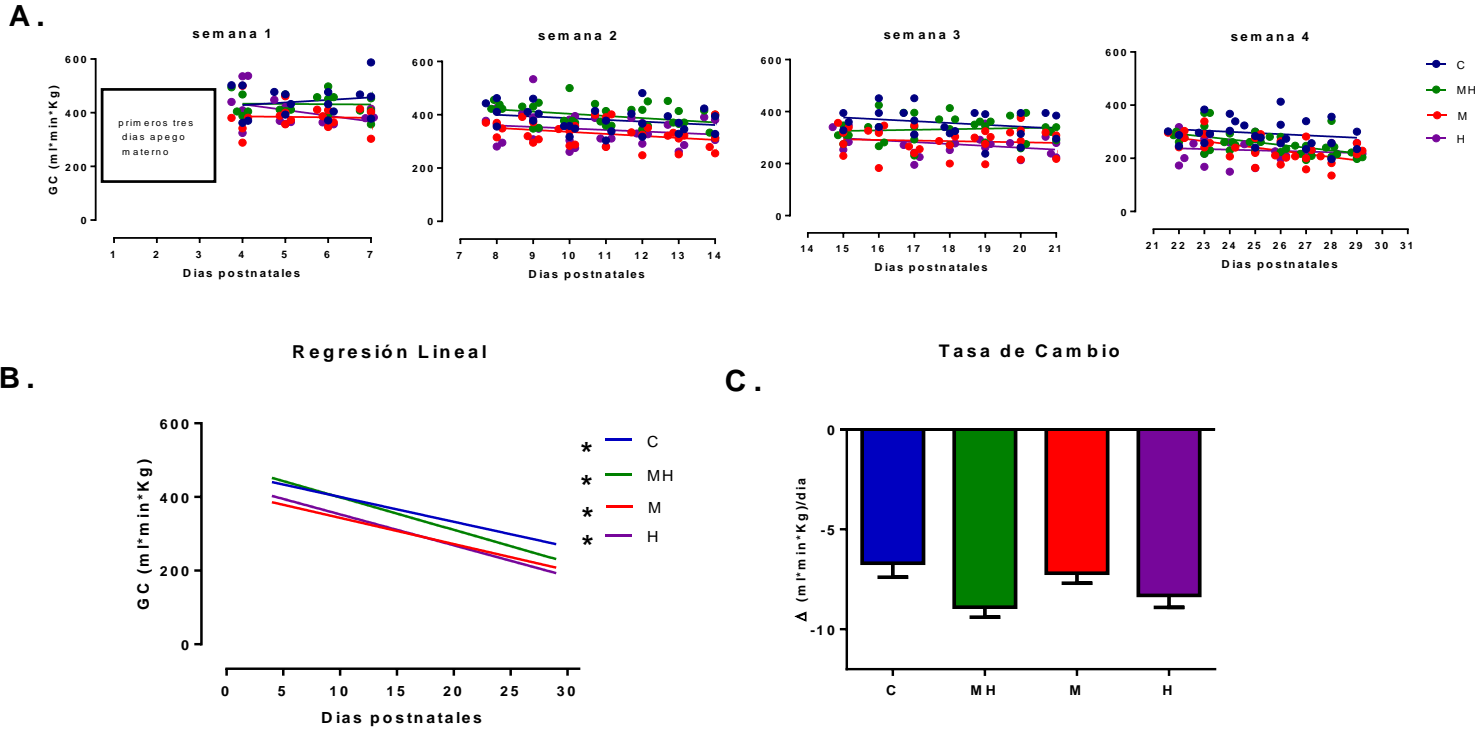


Figura 13. Gasto cardíaco I. Variable cardíaca medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo del gasto cardíaco (GC), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

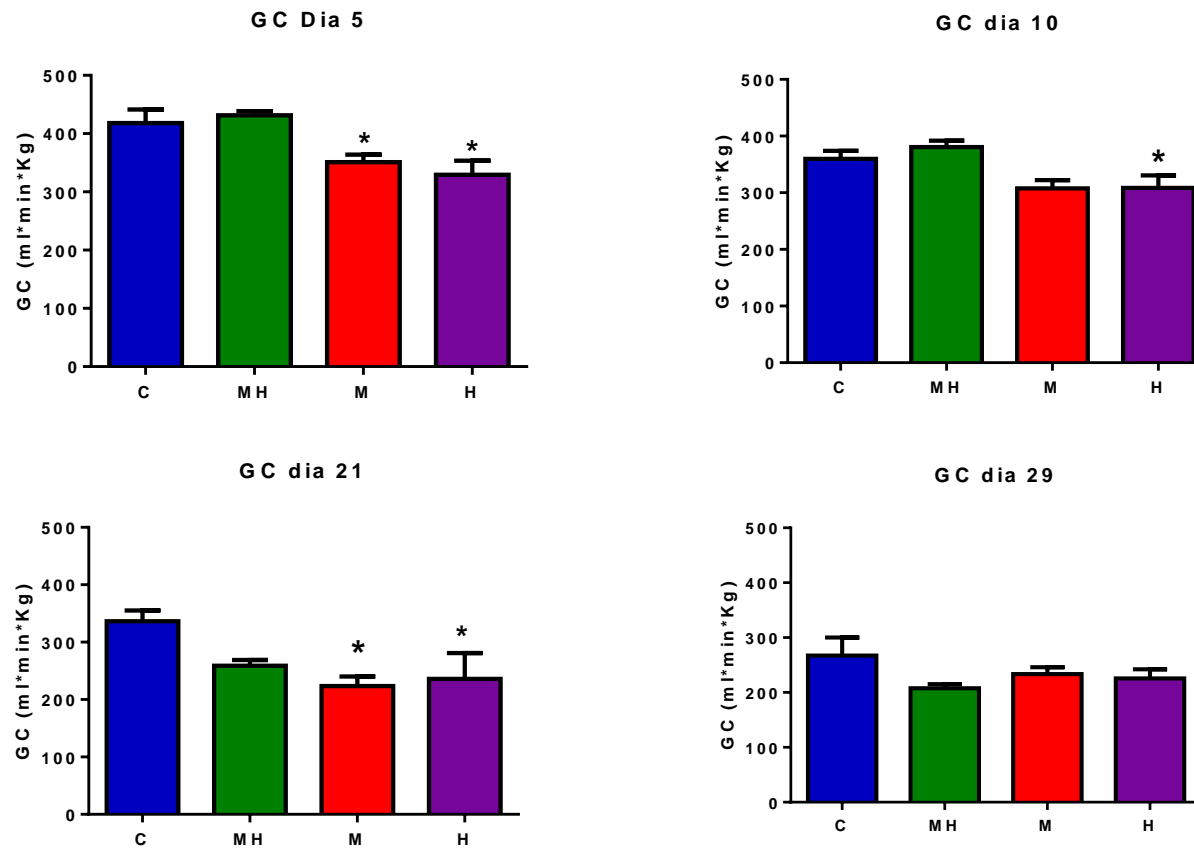


Figura 14. Gasto cardíaco II. Análisis de la variable GC durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Ventana Terapéutica Farmacológica Sin tratamiento

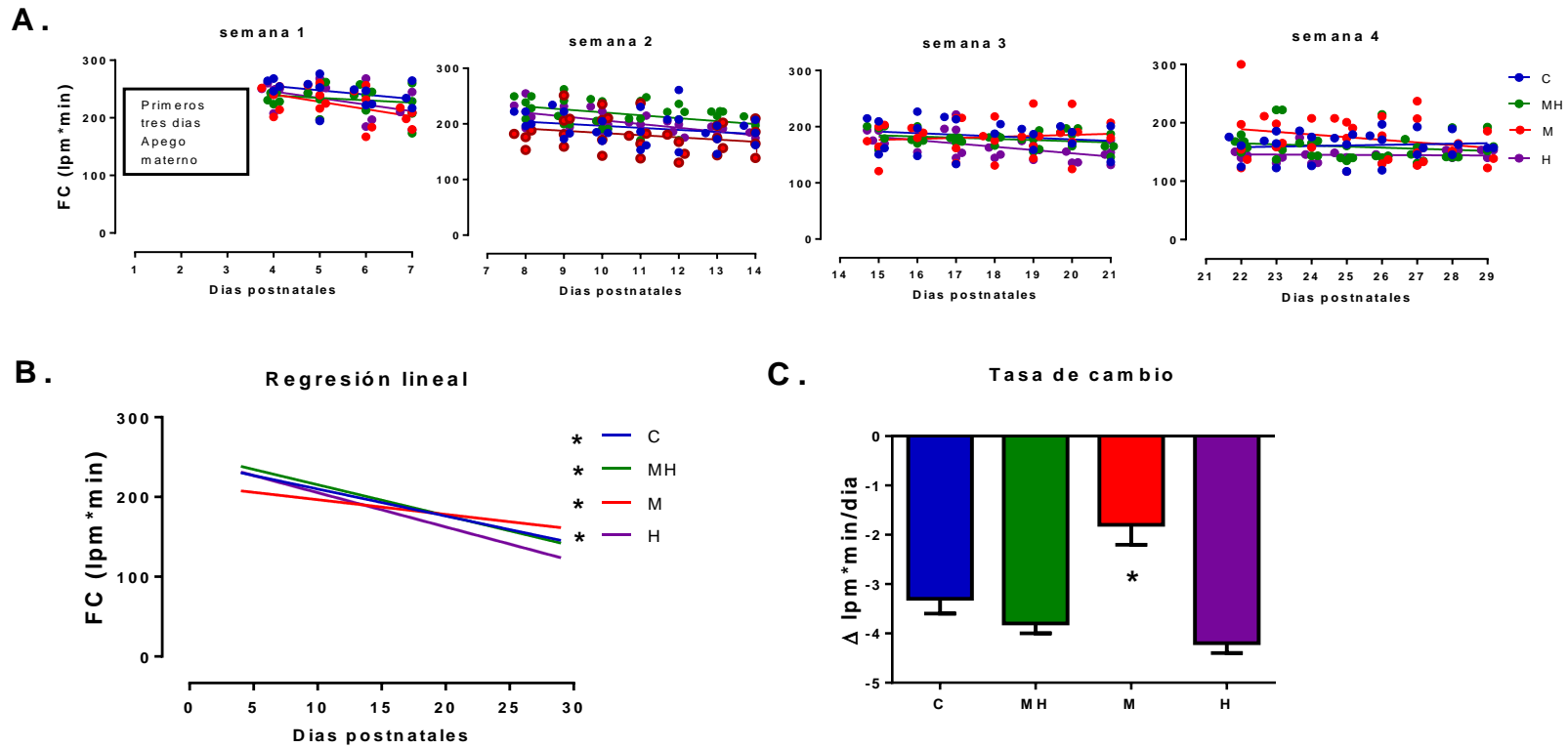


Figura 15. Frecuencia cardíaca I. Variable cardíaca medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo de la frecuencia cardíaca (FC), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

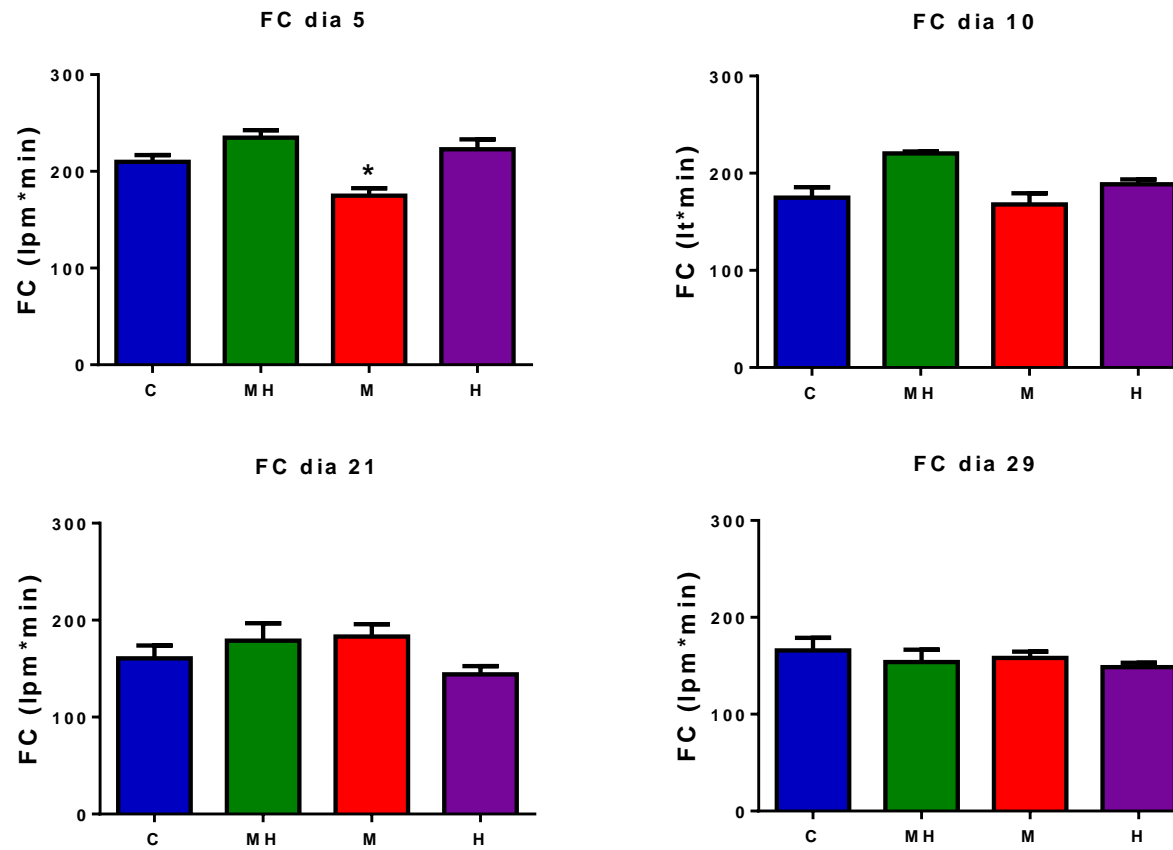
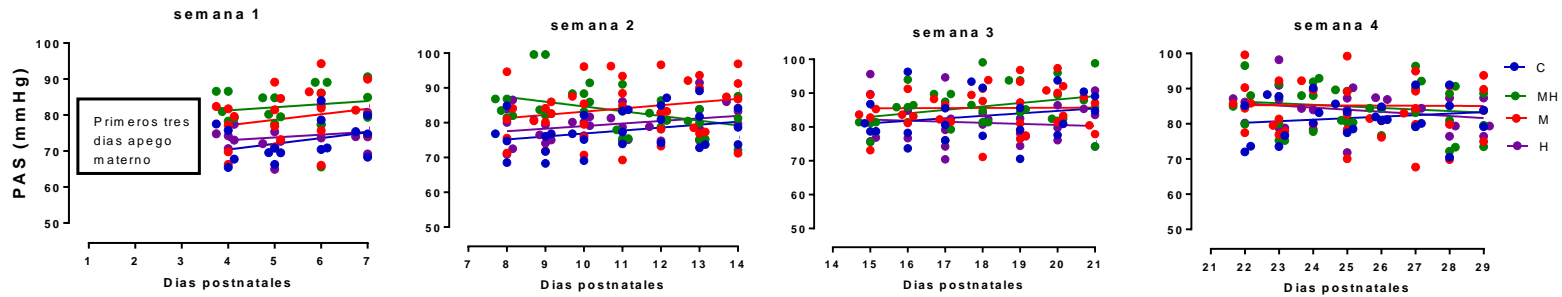


Figura 16. Frecuencia cardíaca II. Análisis de la variable FC durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

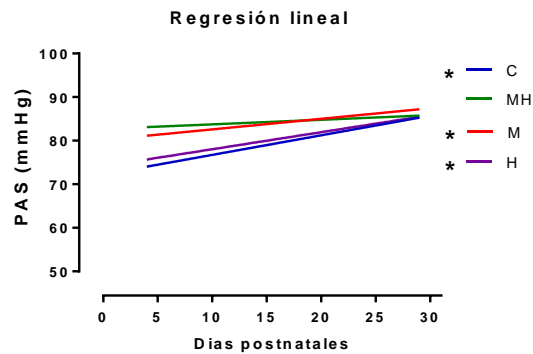
Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

A.



B.



C.

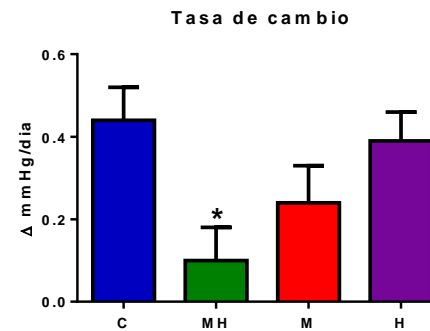


Figura 17. Presión arterial sistémica I. Variable sistémica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo de la presión arterial sistémica (PAS), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

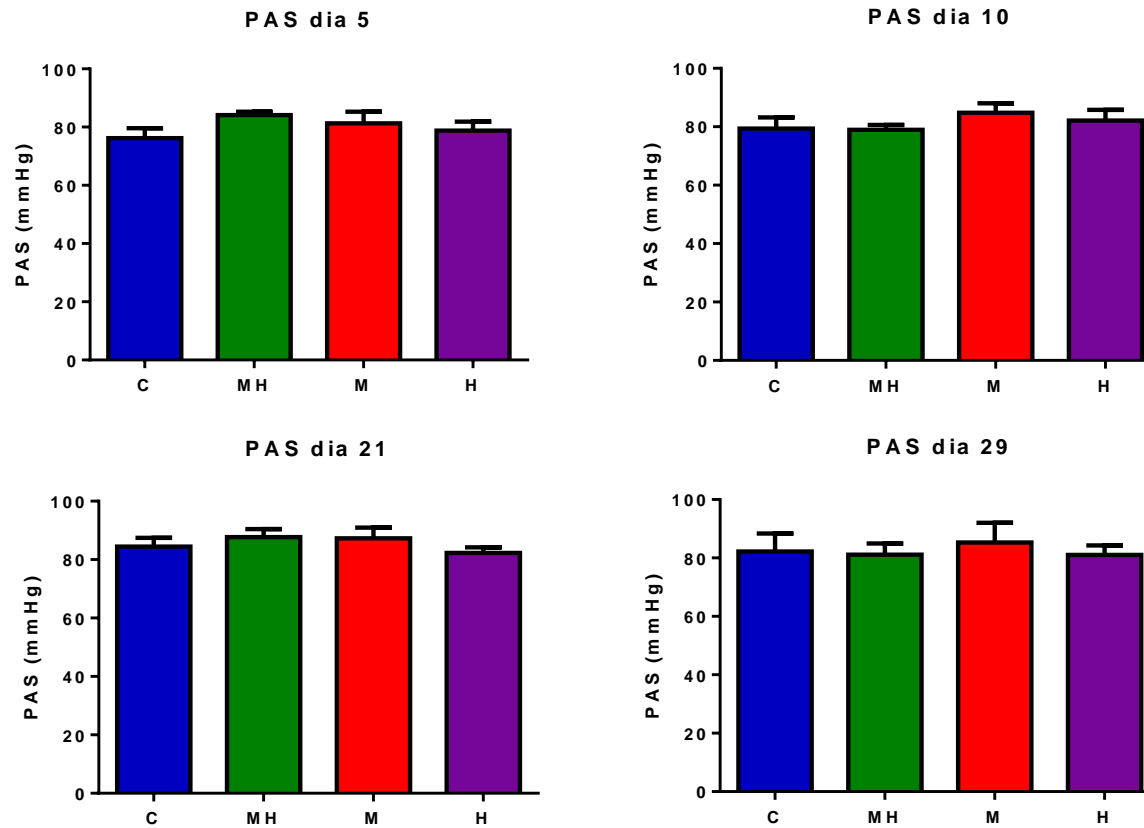


Figura 18. Presión arterial sistémica II. Análisis de la variable PAS durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

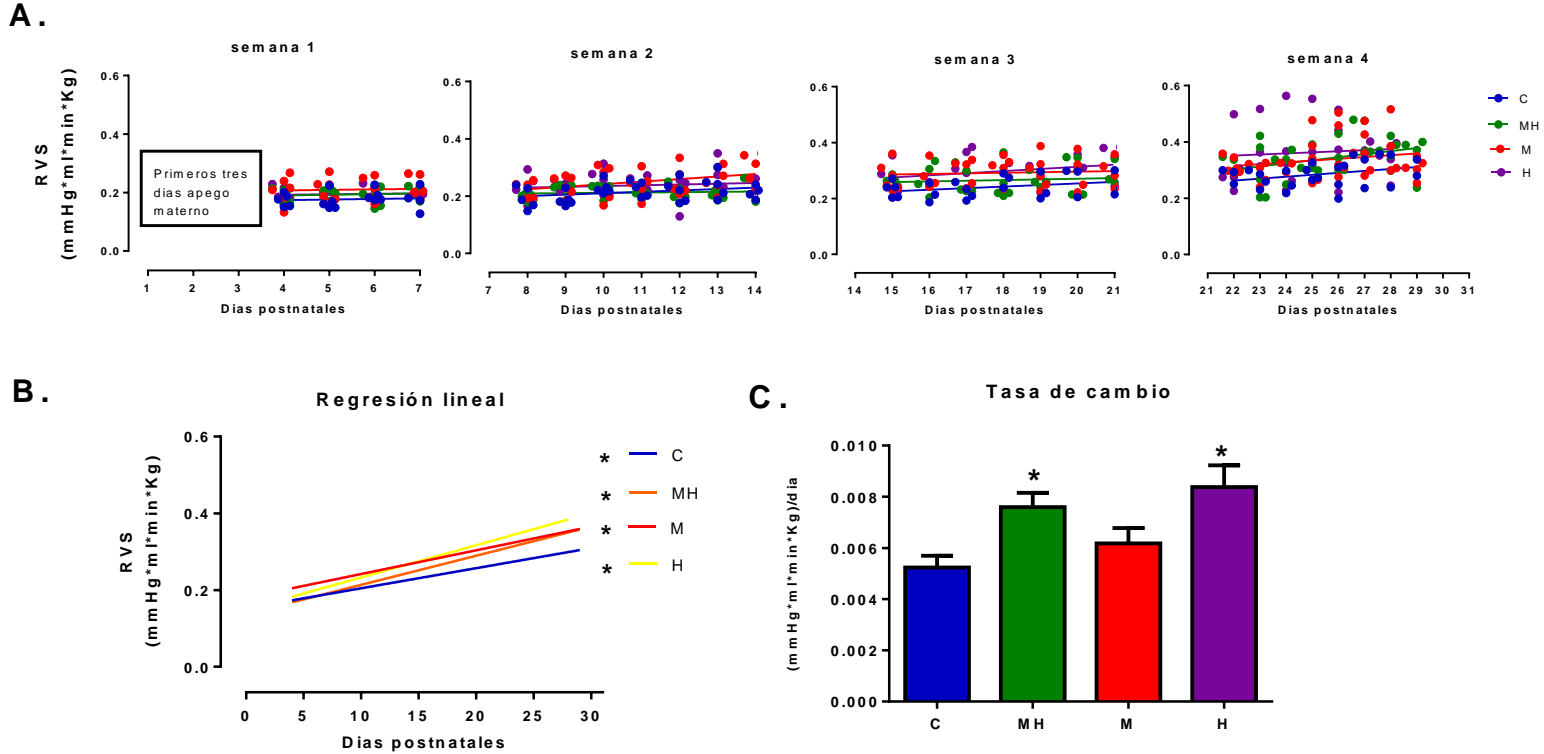


Figura 19. Resistencia vascular sistémica I. Variable sistémica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo de la resistencia vascular sistémica (RVS), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

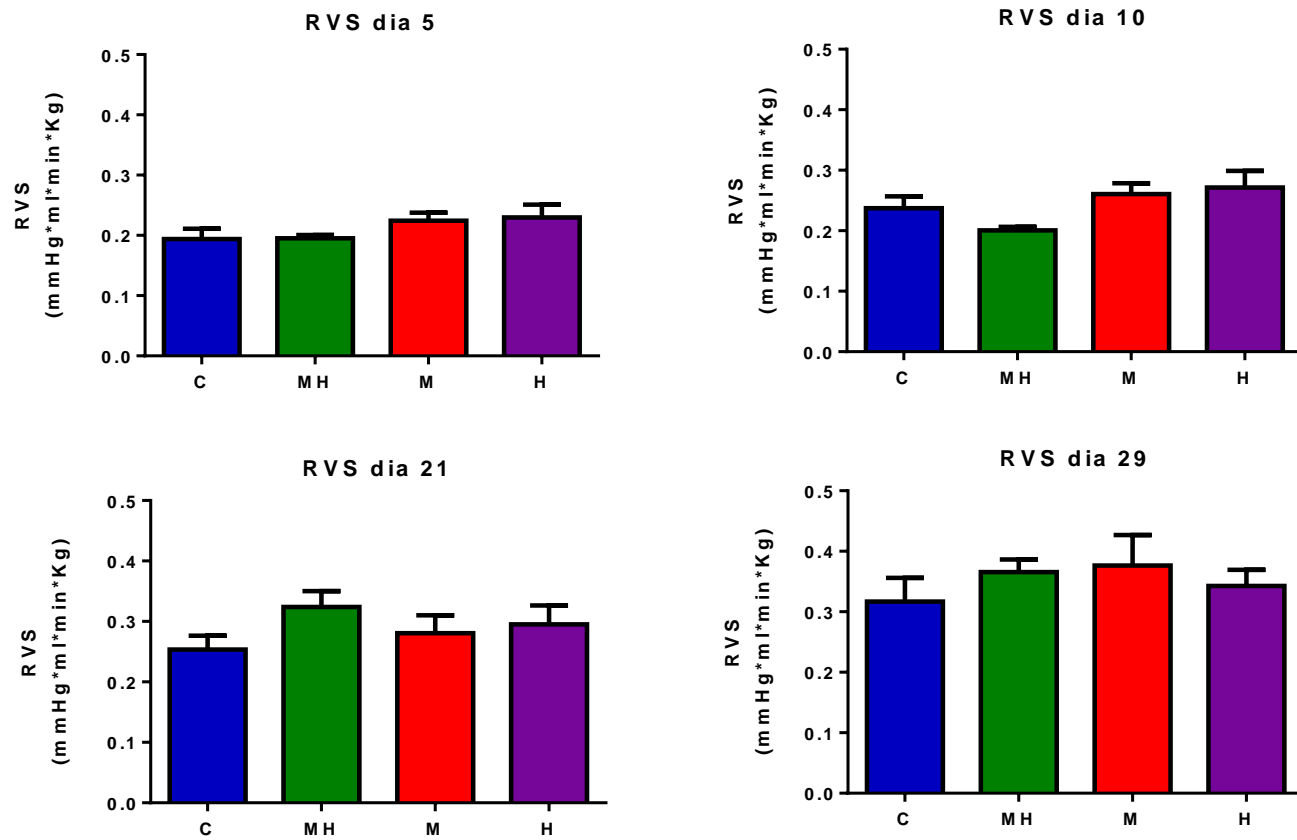


Figura 20. Resistencia vascular sistémica II. Análisis de la variable RVS durante los días: 5, 10, 21 y 28 postnatales. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Objetivo Específico 2. Determinar *ex vivo* la función vascular pulmonar en arterias de resistencia, usando fármacos vasoactivos mediante miografía de alambre.

La función vascular de las arterias de resistencia pulmonar (diámetro interno de 200-400 μm) se determinó a través de un análisis *ex vivo* por miografía de alambre. Para esto, se estableció un protocolo para evaluar las diferentes vías vasoactivas que determinan la vasorreactividad del lecho vascular pulmonar. El análisis de la función vasoconstrictora se determinó a través de dosis ascendentes de potasio (K^+ , Figura 21). Con respecto al efecto máximo (E_{max}) o capacidad contráctil, el grupo M presentó una menor vasoconstricción máxima con respecto a C y H. En contraste, el grupo MH mostró una mayor capacidad contráctil con respecto al grupo C (Figura 21B). Por otro lado, todos los grupos presentaron una sensibilidad similar a K^+ (Figura 21C).

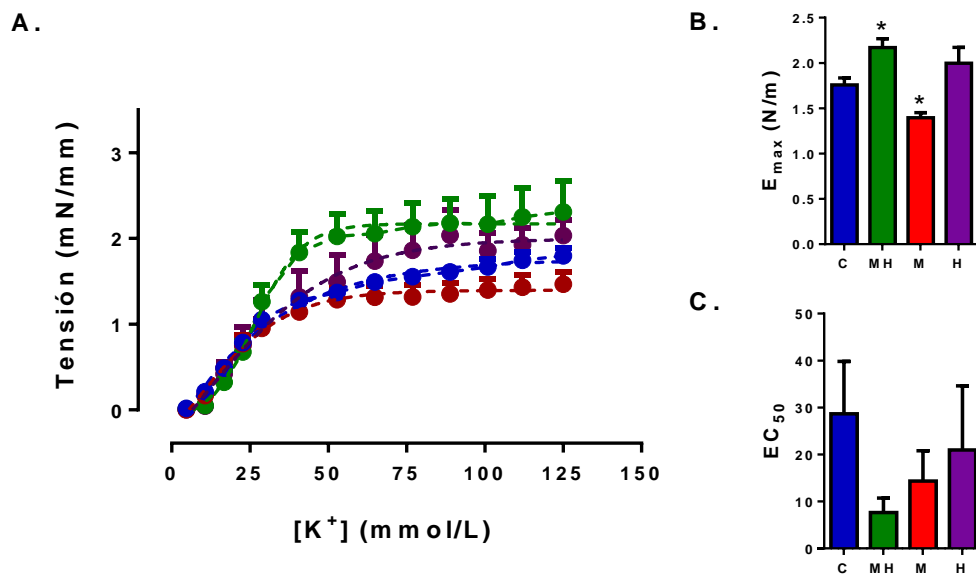


Figura 21. Respuesta vasoconstrictora a potasio (KCl). A) Curva dosis respuesta de KCl, B) respuesta máxima E_{max} , y C) sensibilidad EC_{50} . Se realizó un ajuste de los datos a una curva tipo Boltzmann. Además, se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnett para el análisis del E_{max} y la EC_{50} . Los grupos son: control (C, azul, $n=5$), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, $n=5$), tratado con melatonina (M, rojo, $n=5$) y tratado con hemina (H, morado, $n=5$). Los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

La respuesta vasoactiva a serotonina fue similar entre grupos (Figura 22), tanto para la respuesta máxima (Figura 22B), como para la sensibilidad a este agente vasoactivo (Figura 22C). Por otro lado, en la respuesta a endotelina-1, el grupo M tuvo una menor respuesta máxima versus el grupo C (Figura 23A y B). Sin embargo, con respecto a la sensibilidad expresada como pD_2 , solo el grupo MH mostró una mayor sensibilidad relativo al grupo C (Figura 23C). Finalmente, la respuesta a un mimético de tromboxano (U46619)(Figura 24),

mostró una menor respuesta máxima en el grupo M (Figura 24B), mientras que la sensibilidad fue similar entre los grupos analizados (Figura 24C).

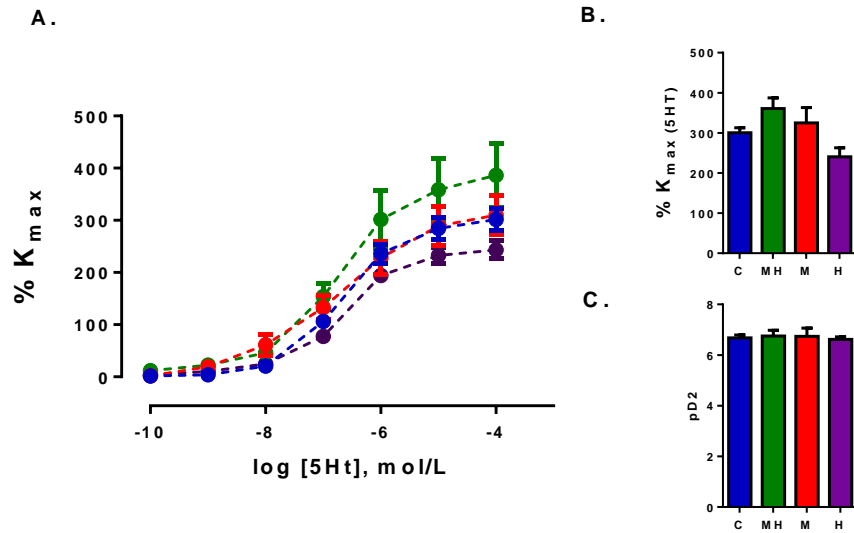


Figura 22. Respuesta vasoconstrictora a serotonina (5HT). A) Curva dosis respuesta a serotonina, B) respuesta máxima Emax, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del Emax y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

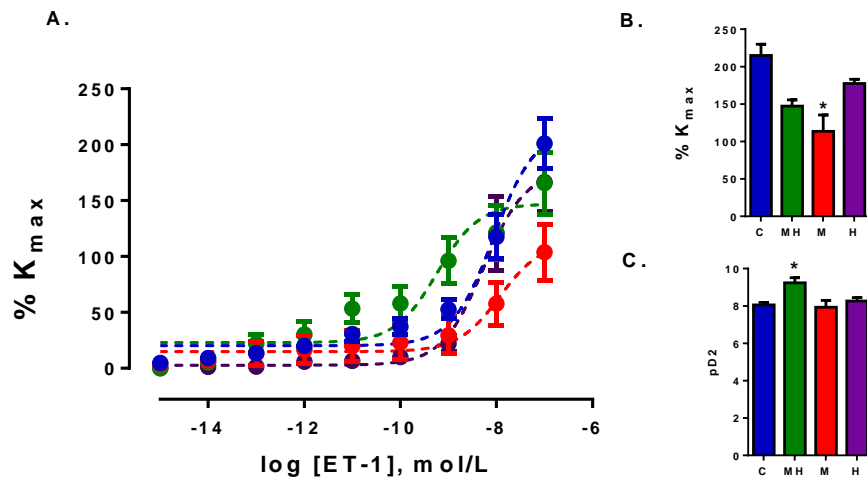


Figura 23. Respuesta vasoconstrictora a endotelina-1. A) Curva dosis respuesta a endotelina -1, B) respuesta máxima E_{max}, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del E_{max} y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), (continuación) tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

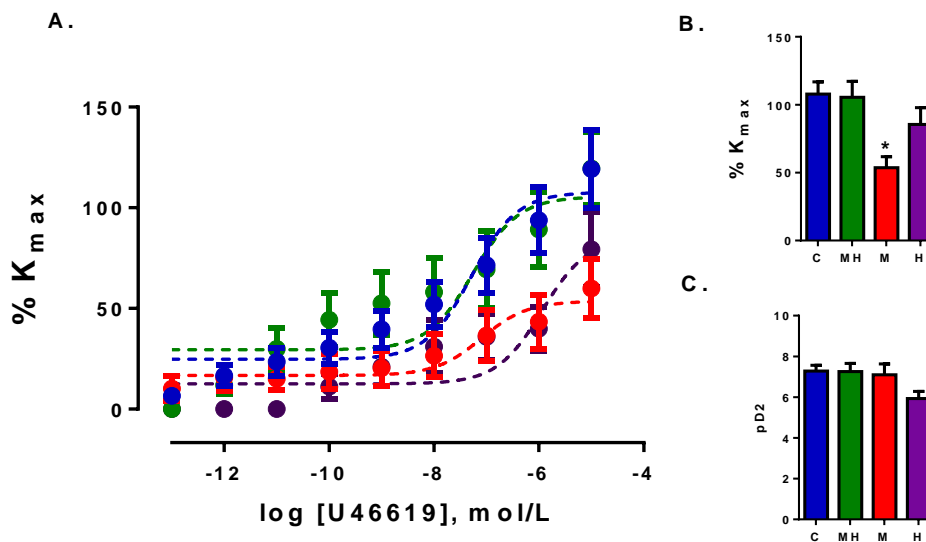


Figura 24. Respuesta vasoconstrictora a tromboxano. A) Curva dosis respuesta a tromboxano, B) respuesta máxima E_{max}, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del E_{max} y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

En esta tesis evaluamos la vasodilatación dependiente e independiente de la función endotelial. Para determinar la función vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas dosis respuesta a metacolina (Figura 25). En este sentido, el grupo MH mostró una mayor vasodilatación máxima en comparación al grupo C y a los tratamientos por separado (M y H) (Figura 25B). En contraste, la sensibilidad aumentó en M y H (Figura 25C). La función vasodilatadora dependiente de NO fue evaluada previa incubación con L-NAME (inhibidor selectivo de la eNOS), realizando curvas dosis respuesta a metacolina (Figura 26). Como resultado de este análisis, el grupo MH tuvo una mayor vasodilatación remanente respecto al grupo C (Figura 26B). Sin embargo, ningún grupo mostró diferencias significativas con respecto a la sensibilidad a MetCh en presencia de L-NAME (Figura 26C). La respuesta vasodilatadora dependiente de músculo se realizó a través de curvas dosis respuesta a nitroprusiato de sodio (SNP, Figura 27). En este contexto, los grupos M y H mostraron una vasodilatación máxima y sensibilidad mayores en comparación al grupo C (Figura 27B y C).

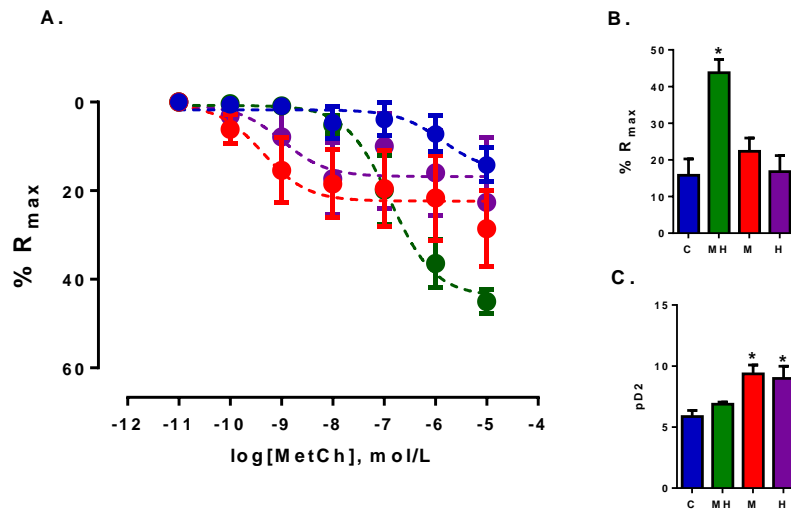


Figura 25. Respuesta vasodilatadora a metacolina (Metch). A) Curva dosis respuesta a metacolina, B) respuesta máxima E_{max}, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del E_{max} y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

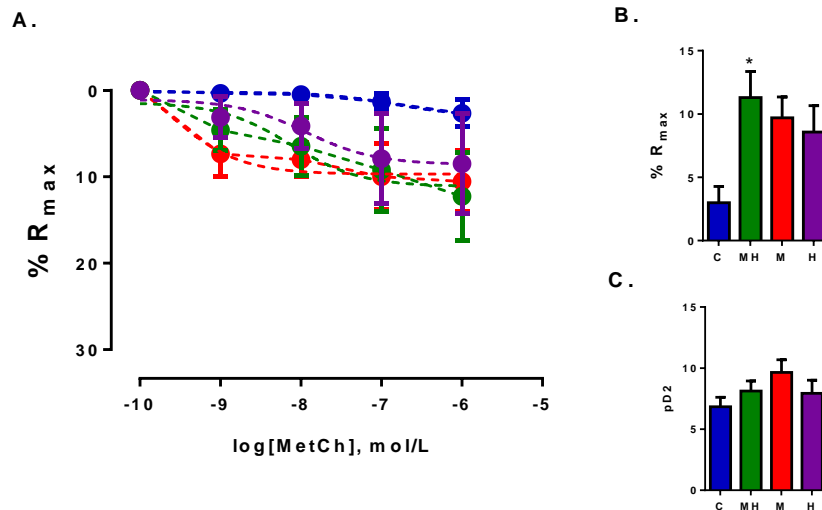


Figura 26. Respuesta vasodilatadora a metacolina (Metch) con bloqueo de eNOS. A) Curva dosis respuesta a metacolina con incubación con L-NAME, B) respuesta máxima E_{max}, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del E_{max} y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

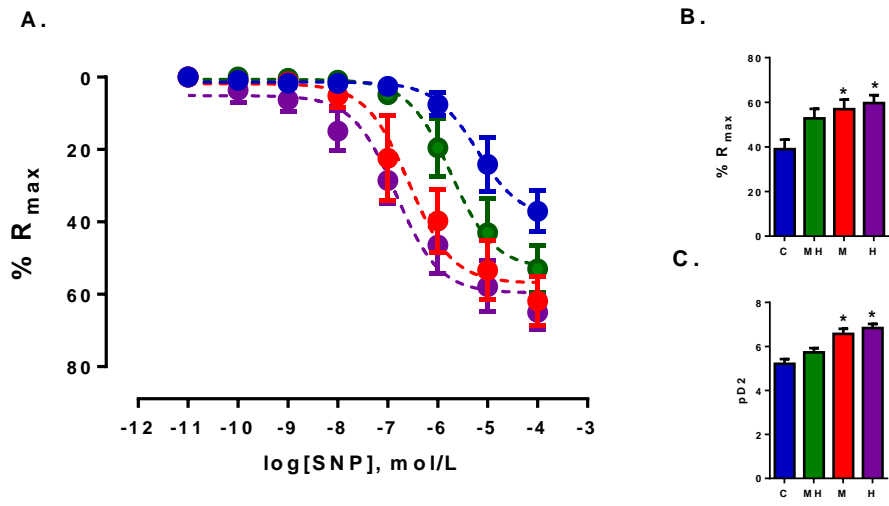


Figura 27. Respuesta vasodilatadora a nitroprusiato de sodio (SNP). A) Curva dosis respuesta a nitroprusiato de sodio, B) respuesta máxima E_{max}, y C) sensibilidad pD₂. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis del E_{max} y la pD₂, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=5), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con (continuación) melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=5). Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

Objetivo Específico 3. Determinar *in vitro* la expresión y actividad de moléculas relacionadas con la función vasodilatadora y vasoconstrictora en tejido pulmonar, mediante ensayos de biología molecular y bioquímica.

Expresión de transcrito

El análisis de la expresión de transcrito (mRNA) de las diferentes vías vasoactivas se realizó por RT-PCR. Al analizar la vía dependiente de serotonina, sólo se observó una disminución en la expresión del transcrito del receptor 5HT2B con el tratamiento combinado MH al compararlo con el grupo C y con los tratamientos por separados (M y H) (Figura 28B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en relación a los receptores 5HT2A, 5HT1B/D y al transportador de serotonina 5HTT (Figura 28). Asimismo, la vía dependiente de endotelina no mostró cambios significativos en la expresión del receptor ETa (Figura 29A). En contraste, el tratamiento con M indujo la expresión del receptor ETb con respecto al grupo C (Figura 29B).

Con respecto a la expresión de la eNOS, no hubo cambio en la expresión de este gen entre los grupos analizados (Figura 30A). De igual forma, no se registraron cambios significativos entre los grupos analizados para la expresión de la COX 1 (Figura 30B). Sin embargo, el grupo M presentó una expresión de COX 2 menor, en comparación con el grupo C (Figura 30C).

Para la expresión de mRNA de la vía dependiente de PGI (Figura 31), el grupo M tuvo un aumento en la expresión de PGIs con respecto al grupo C y a las demás alternativas terapéuticas (MH y H) (Figura 31A). Con respecto a la

evaluación del receptor 1β , no se encontraron diferencias significativas en su expresión entre los grupos analizados (Figura 31B). Finalmente, la expresión de transcrito de la vía vasoconstrictora TXs- $T\beta$, no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 32).

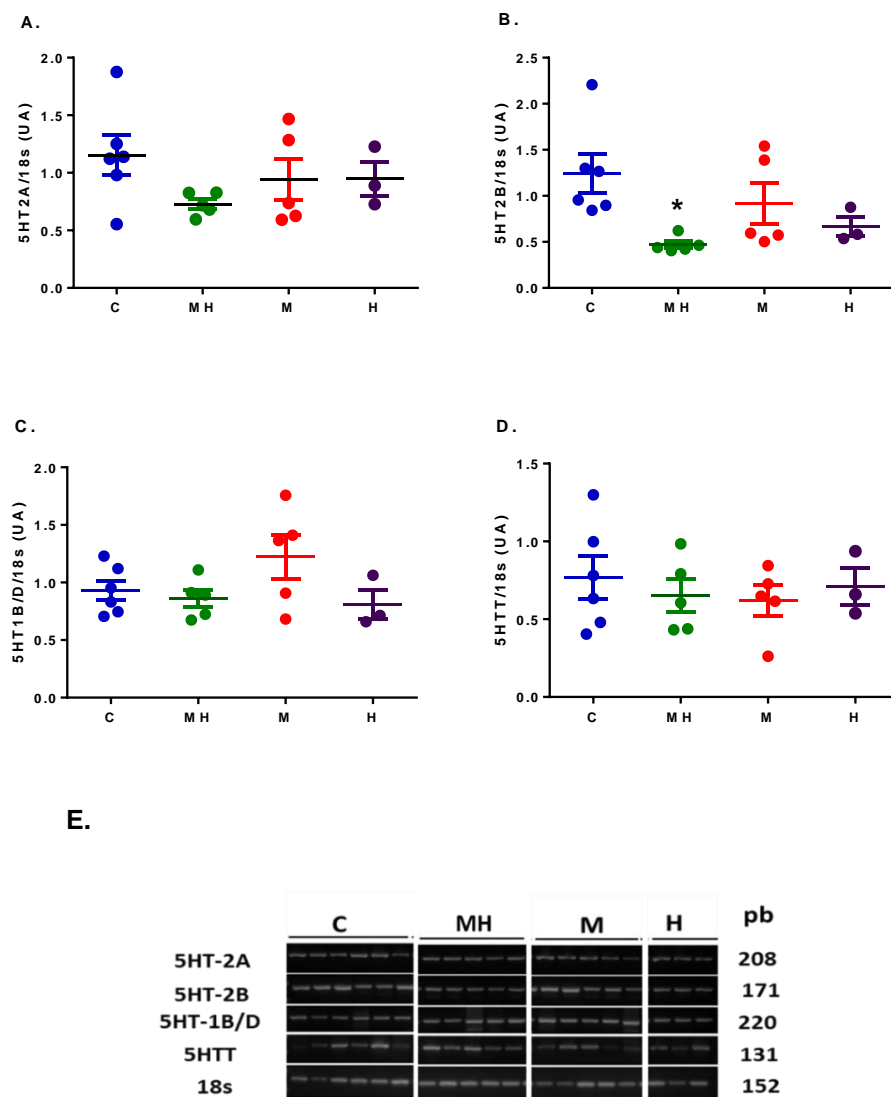


Figura 28. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía serotoninérgica. A) Expresión del transcrito 5HT2A, B) expresión del transcrito 5HT2B, C) expresión del transcrito 5HT1D/B, D) expresión del transcrito de 5HTT y E) imagen representativa de los PCRs realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

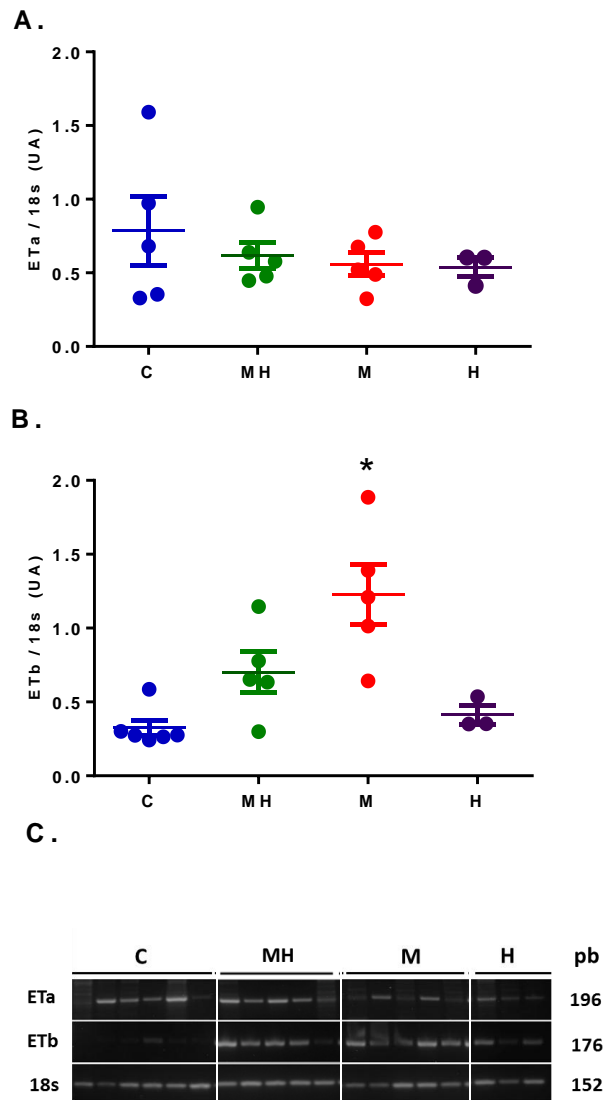


Figura 29. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía de endotelina 1. A) Expresión del transcrito del receptor ETa, B) expresión del transcrito del receptor ETb y C) imagen representativa de los PCRs realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

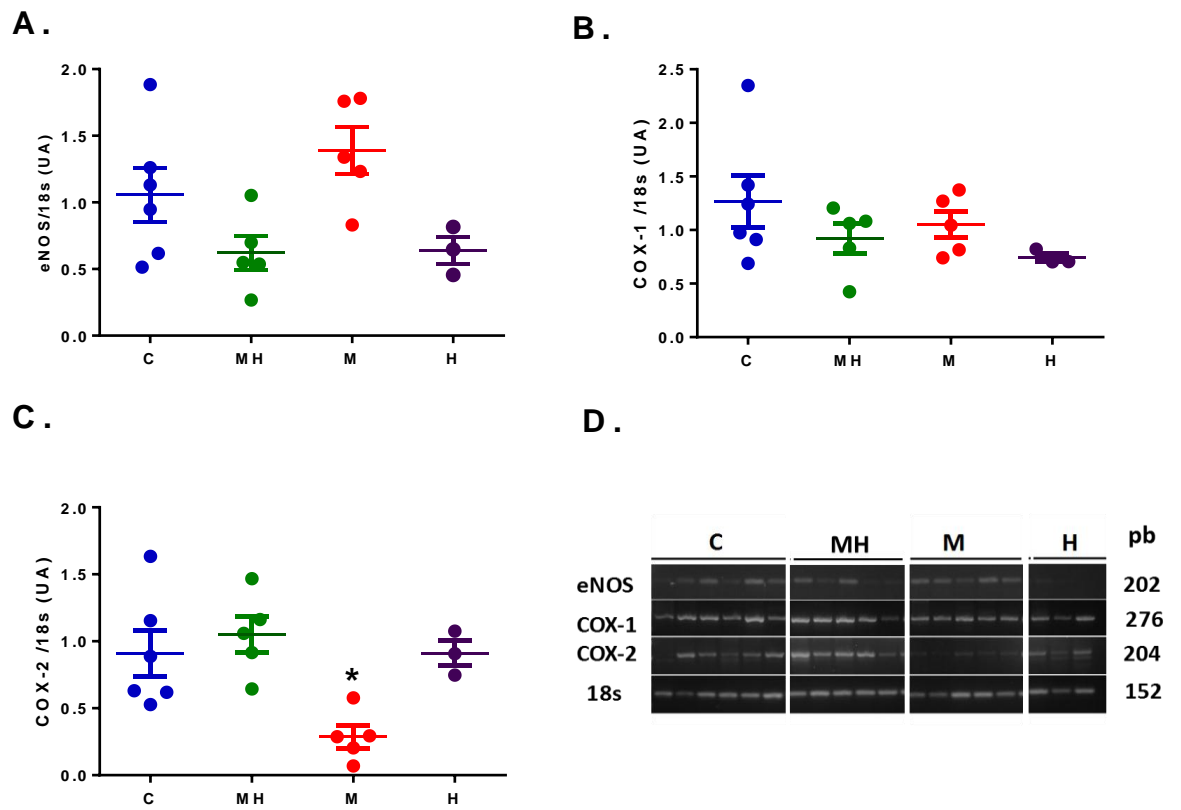


Figura 30. Expresión de mensajero (mRNA) de vasodilatadores. A) Expresión del transcrito de eNOS, B) expresión del transcrito de COX 1, C) expresión de transcrito de COX 2 y D) imagen representativa de los PCRs realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

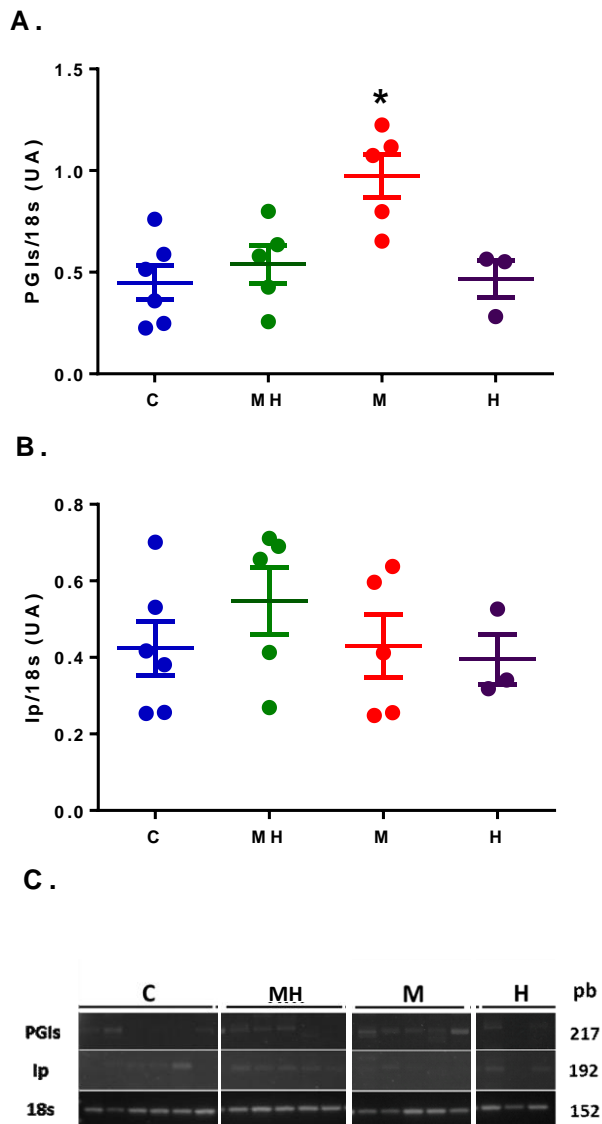


Figura 31. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía PGI₂-IP. A) Expresión del transcrito de PGI₂, B) expresión del transcrito del receptor Ip y C) imagen representativa de los PCRs realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

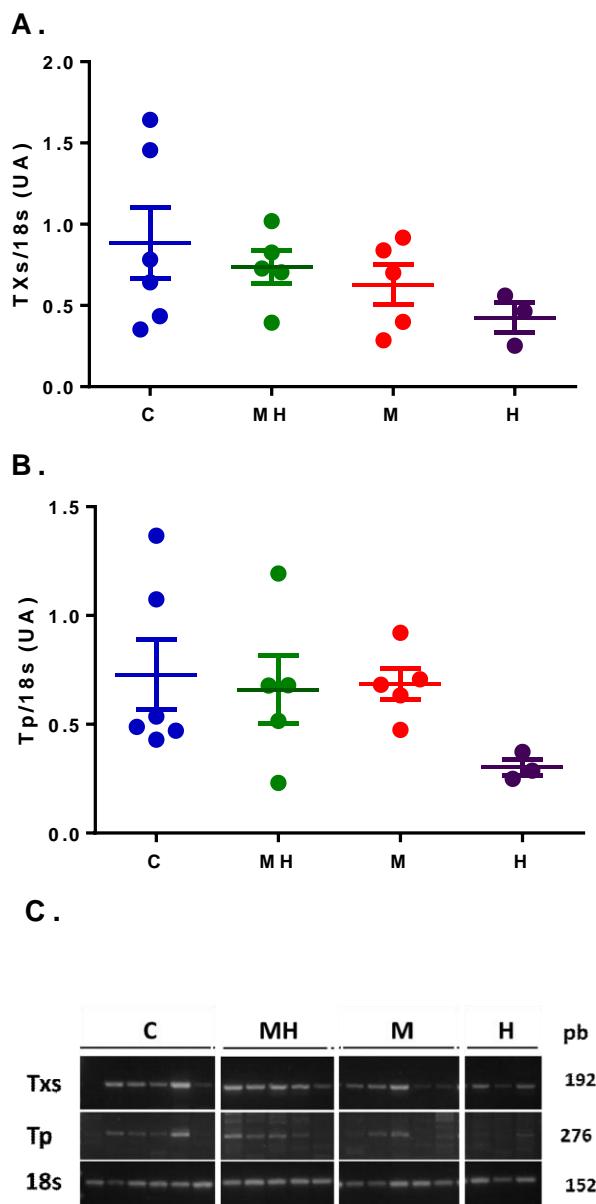


Figura 32. Expresión de mensajero (mRNA) de la vía TXs-Tp. A) Expresión del transcrito de TXs, B) expresión del transcrito del receptor Tp y C) imagen representativa de los PCRs realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Expresión de proteína

El análisis de la expresión de proteínas asociadas al tratamiento demostró que el grupo H tuvo un aumento significativo en la expresión de la hemoxigenasa-1 y 2 con respecto al grupo C (Figura 33A, B). En contraste, el grupo M disminuyó la expresión de HO-1 y HO-2 en comparación al grupo C (Figura 33A, B). Finalmente, la expresión de proteína de los canales BKCa, mostró un incremento significativo en todos los grupos tratados (M, MH y H) con respecto al grupo C, con un mayor aumento en los grupos tratados con hemina (Figura 33C).

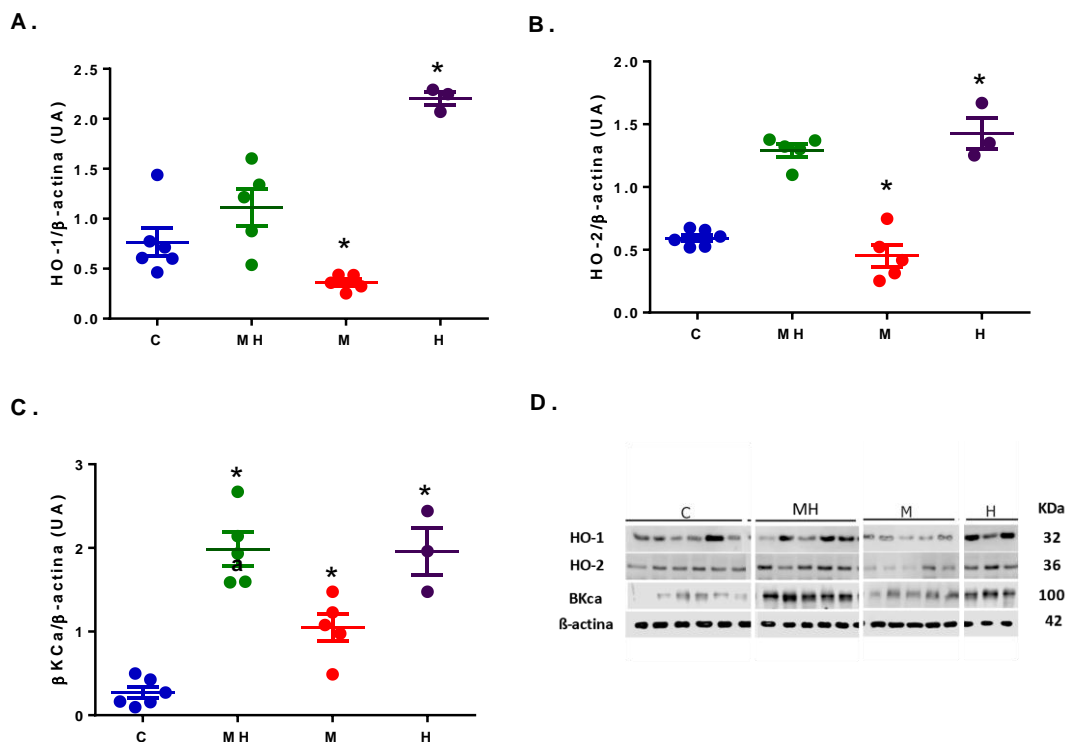


Figura 33. Expresión de proteína de las hemoxigenasa y BKCa. A) Expresión de hemoxigenasa 1 (HO1), B) expresión de hemoxigenasa 2 (HO-2), C) expresión de BKCa y D) imagen representativa del Western blot realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, promedio \pm ESM verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): *vs C.

Al analizar la vía vasodilatadora dependiente de óxido nítrico, observamos que la expresión de eNOS es similar entre grupos (Figura 34A), mientras que río abajo, en la expresión de la guanilato ciclasa soluble (GCs), sólo el grupo M mostró un aumento en su expresión (Figura 34B). No obstante, sólo el grupo MH mostró un aumento en la expresión de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) en comparación con el grupo C (Figura 34C).

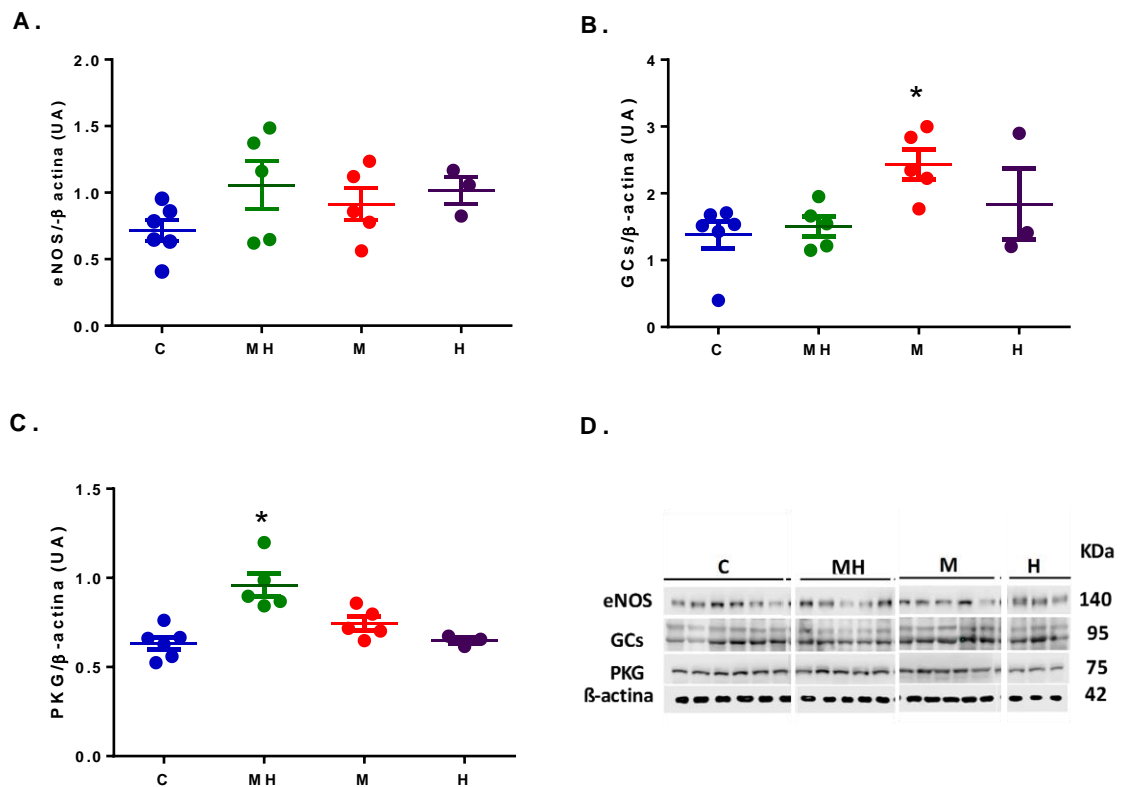


Figura 34. Expresión de proteínas de la vía oxidonitrérgica. A) Expresión de la óxido nítrico endotelial (eNOS), B) expresión de la guanilato ciclasa soluble, C) expresión de proteína de la quinasa dependiente de GMPc y D) imagen representativa de los western blot (continuación) realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

En el análisis de la expresión de proteínas de la vía prostanoide, la expresión de las ciclooxigenas (COX-1 y COX-2) no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 35).

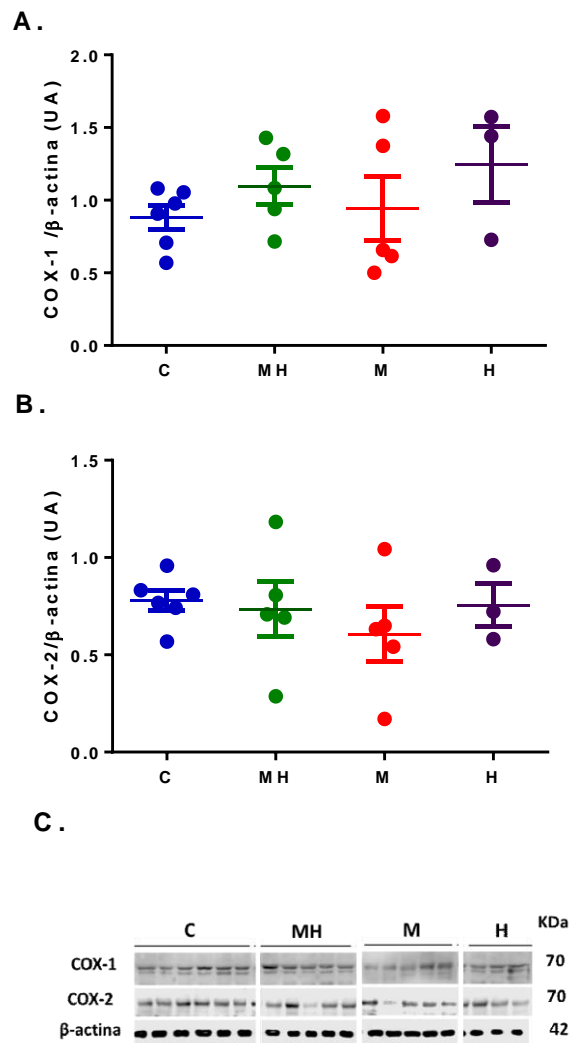


Figura 35. Expresión de proteínas de las ciclooxigenas. A) Expresión de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), B) expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y C) imagen representativa de los western blot realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Respecto a la vía vasodilatadora de prostaciclina (PGIs-Ip), tanto el tratamiento combinado MH como el tratamiento con hemina H mostraron un aumento significativo en la expresión de la PGIs en comparación al grupo C (Fig. 36A). De igual manera, los grupos M y MH evidenciaron un aumento en la expresión del receptor de prostaciclina en comparación al grupo C (Figura 36B).

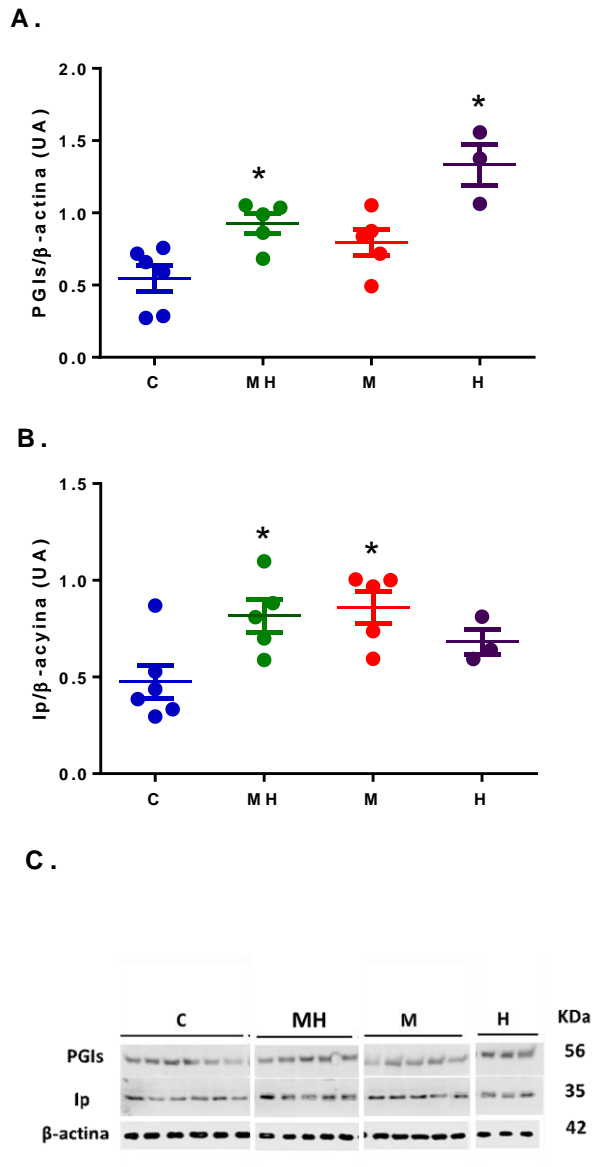


Figura 36. Expresión de proteínas de la vía PGIs-Ip. A) Expresión de la prostaciclina sintasa (PGIs), B) expresión del receptor de prostaciclina (Ip) y C) imagen representativa de los western blot realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

La expresión de proteínas prostanoideas asociadas a la vía vasoconstrictora de tromboxano (TXs-Tp) no tuvo diferencias significativas entre grupos, ni en la

expresión de la tromboxano sintasa (Figura 37A) ni en el receptor para tromboxano (Figura 37B).

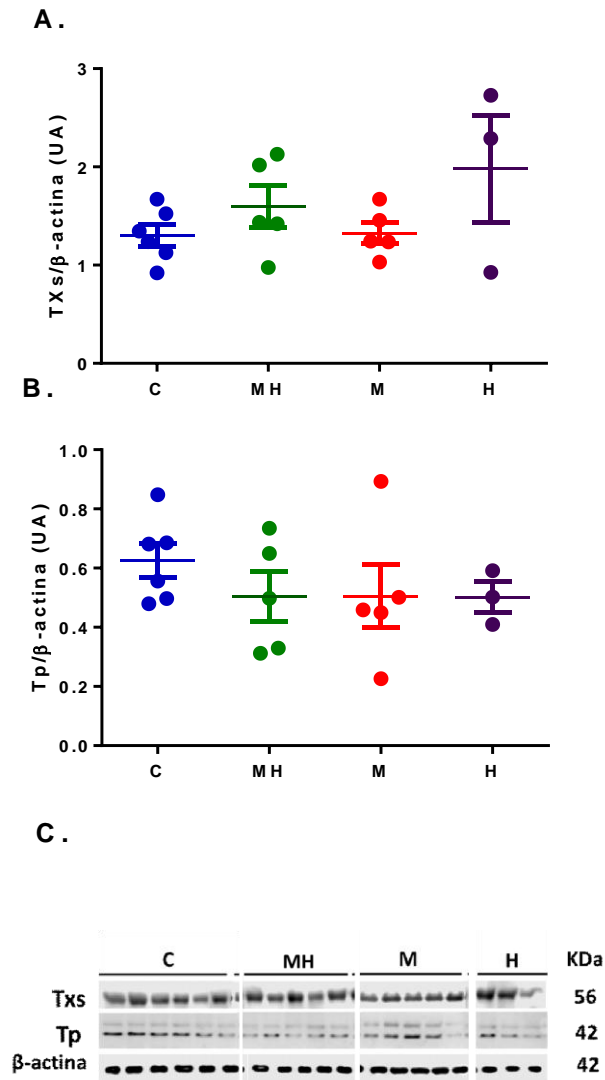


Figura 37. Expresión de proteínas de la vía TXs-Tp. A) Expresión de la tromboxano sintasa (TXs), B) expresión del receptor de tromboxano (Tp) y C) imagen representativa de los western blot realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Objetivo Específico 4. Determinar el nivel de estrés oxidativo en tejido pulmonar.

El balance oxidativo se evaluó en función de las fuentes pro-oxidantes, capacidad antioxidante y marcadores de estrés oxidativo.

Fuentes prooxidantes

Con la finalidad de determinar el grado de traslocación de la subunidad activatoria de la NADPH oxidasa, se realizaron ensayos de Western blot para la proteína p47phox en citoplasma y en membranas plasmáticas aisladas (Figura 38). En este sentido, el grupo M tuvo una menor traslocación con respecto al grupo C (Figura 38). Adicionalmente, en la evaluación de la fosforilación activatoria de la NADPH oxidasa (ser 370) en tejido pulmonar, se observó que los tratamientos por separado (M y H) disminuyeron de manera significativa la expresión de la subunidad p47-phox (ser370) en relación al grupo C (Figura 39). Por otro lado, los grupos M y H disminuyeron los niveles de actividad de la xantino oxidasa en comparación al grupo C (Figura 40).

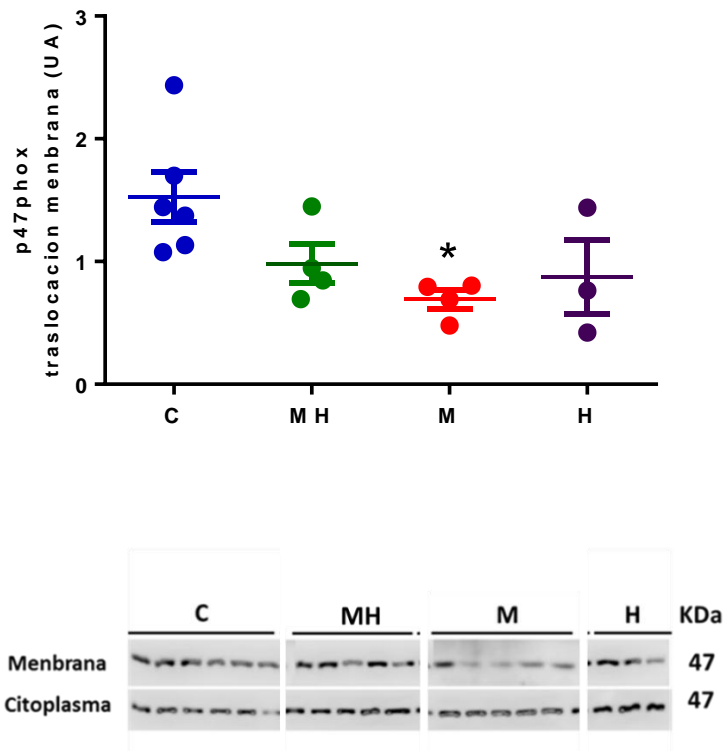


Figura 38. Traslocación de citoplasma/membrana de p47phox. A) Expresión de la subunidad p47 en citoplasma y membrana en tejido pulmonar. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

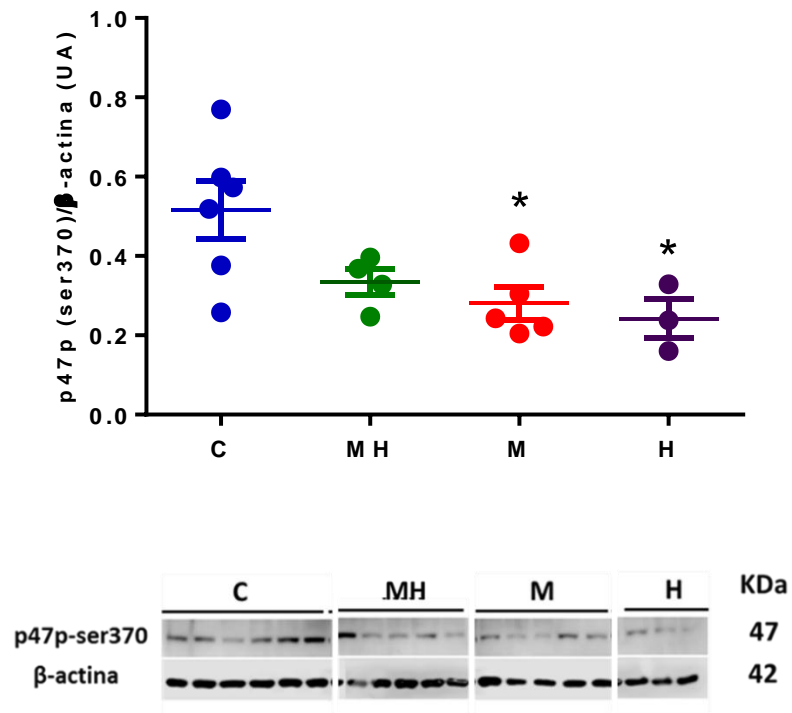


Figura 39. Expresión de proteína de la subunidad p47 fosforilada (ser370). A) Expresión de la subunidad p47-p (ser 370) en tejido pulmonar. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dannet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

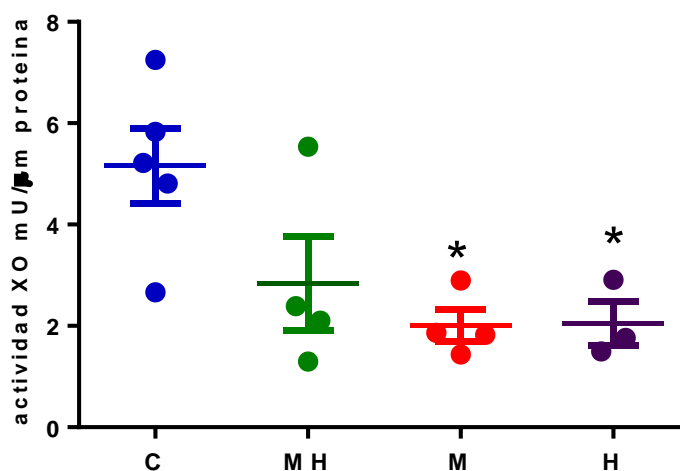


Figura 40. Actividad de la xantino oxidasa (XO). A) Actividad de la xantino oxidasa en tejido pulmonar. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante la actividad de enzimas antioxidantes (Figura 41). En este sentido, la actividad antioxidante asociada a la enzima superóxido dismutasa (SOD), mostró un aumento significativo en el grupo tratado con MH y M en comparación al grupo C, sin cambios en el grupo H (Figura 41A). Con respecto a la actividad de la enzima catalasa (CAT) no se observaron cambios significativos entre los grupos analizados (Figura 41B). Finalmente se observó un aumento en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en tejido pulmonar en el grupo M en comparación al grupo C, sin cambios en los grupos MH y H (Figura 41C).

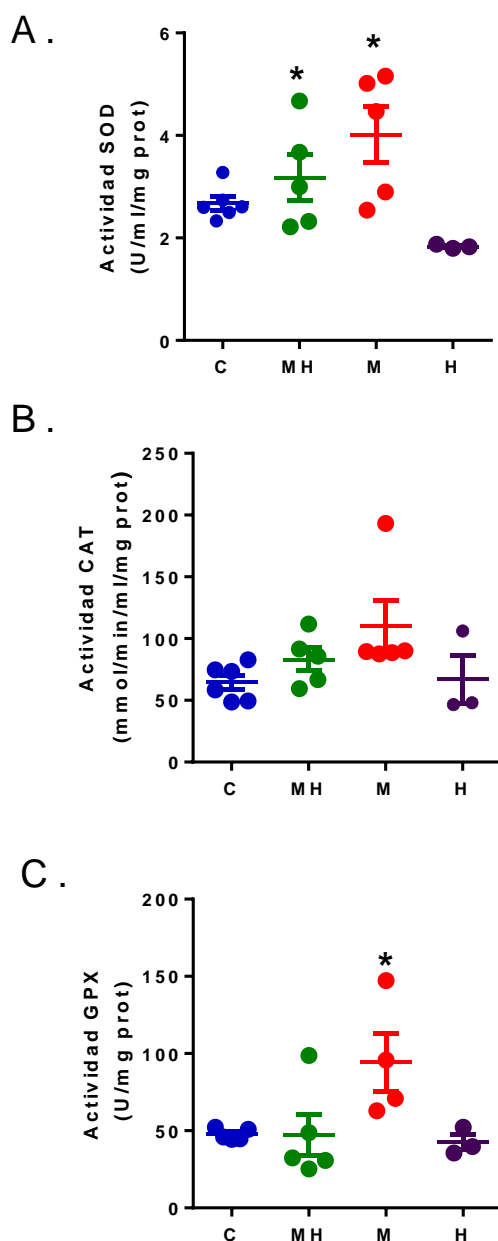


Figura 41. Cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes en tejido pulmonar. A) Actividad de la enzima de la superóxido dismutasa (SOD), B) Actividad de la enzima catalasa (CAT) y C) Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Gpx) Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Barra micrométrica en las fotos: 100 μ m. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Marcadores de estrés oxidativo

La cuantificación del estrés oxidativo se llevó a cabo por medio de diferentes biomarcadores en tejido pulmonar (8-isoprostanos, nitrotirosina y 4-hidroxinonenal). Los niveles de 8-isoprostanos a nivel pulmonar disminuyeron con el tratamiento combinado de MH, mientras que en los otros grupos se mantuvieron constantes (Figura 42).

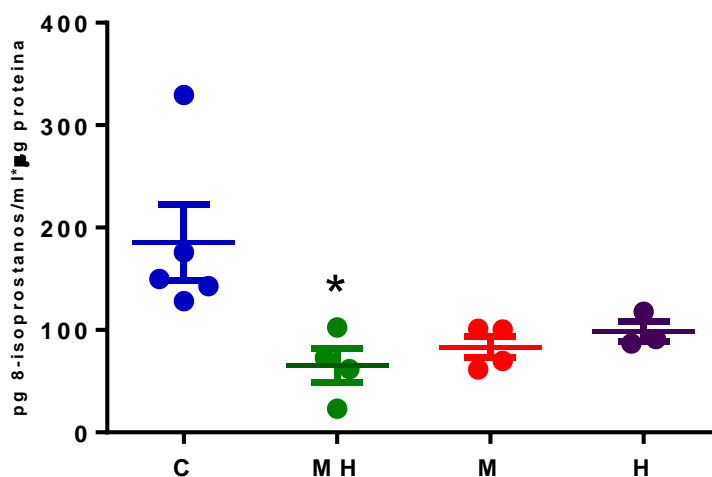


Figura 42. Cuantificación de 8 isoprostanos (8-iso Prostaglandina F2 α) en tejido pulmonar. A) Cuantificación de 8 isoprostanos en tejido pulmonar. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

En relación al marcador proteico de estrés nitrosativo (NT), este mostró una clara disminución en su expresión en los grupos M y MH, en comparación al grupo control (Figura 43A). Sin embargo, el marcador lipídico de estrés oxidativo (4HNE) no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 43B).

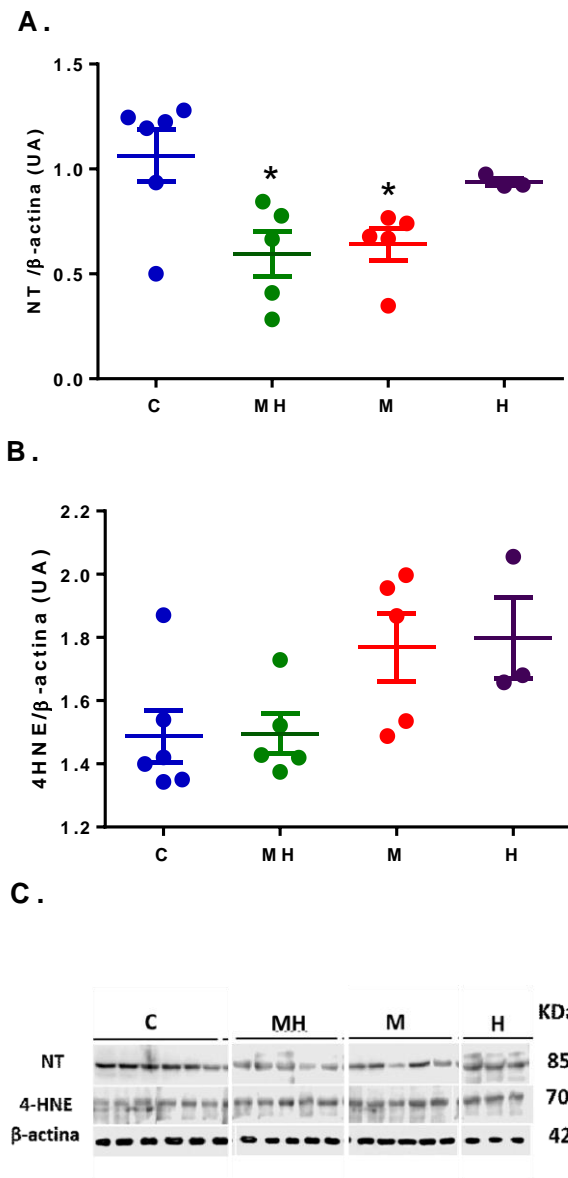


Figura 43. Expresión de marcadores de estrés oxidativo pulmonar. A) Expresión de nitrotirosina en pulmón (NT), B) expresión de 4-hidroxinonenal en pulmón (4HNE) y C) imagen representativa de los western blot realizados. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Objetivo Específico 5. Determinar la histomorfometría, marcadores de proliferación y de remodelamiento de arterias de resistencia pulmonar.

El análisis histomorfométrico de las arterias de resistencia no mostró diferencias significativas en el diámetro interno, diámetro externo, espesor de la capa media y el espesor de la capa adventicia de los diferentes grupos (Figura 44). Tampoco se observaron diferencias significativas en el área luminal entre los grupos analizados. En contraste, el grupo M mostró un aumento del área muscular y adventicia frente al grupo C (Figura 45). Sin embargo, las razones área luminal/área vascular, área muscular/área vascular y área adventicia/área vascular, se mantuvieron constantes entre los grupos analizados (Figura 46).

La cuantificación de la densidad celular se realizó a través del conteo de núcleos con una tinción de Van Gieson elástica, donde los grupos analizados presentaron valores similares (Figura 47). Adicionalmente, se determinó la proliferación celular a través del ensayo inmunohistoquímico del Ki 67, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados con respecto al grupo C (Figura 48).

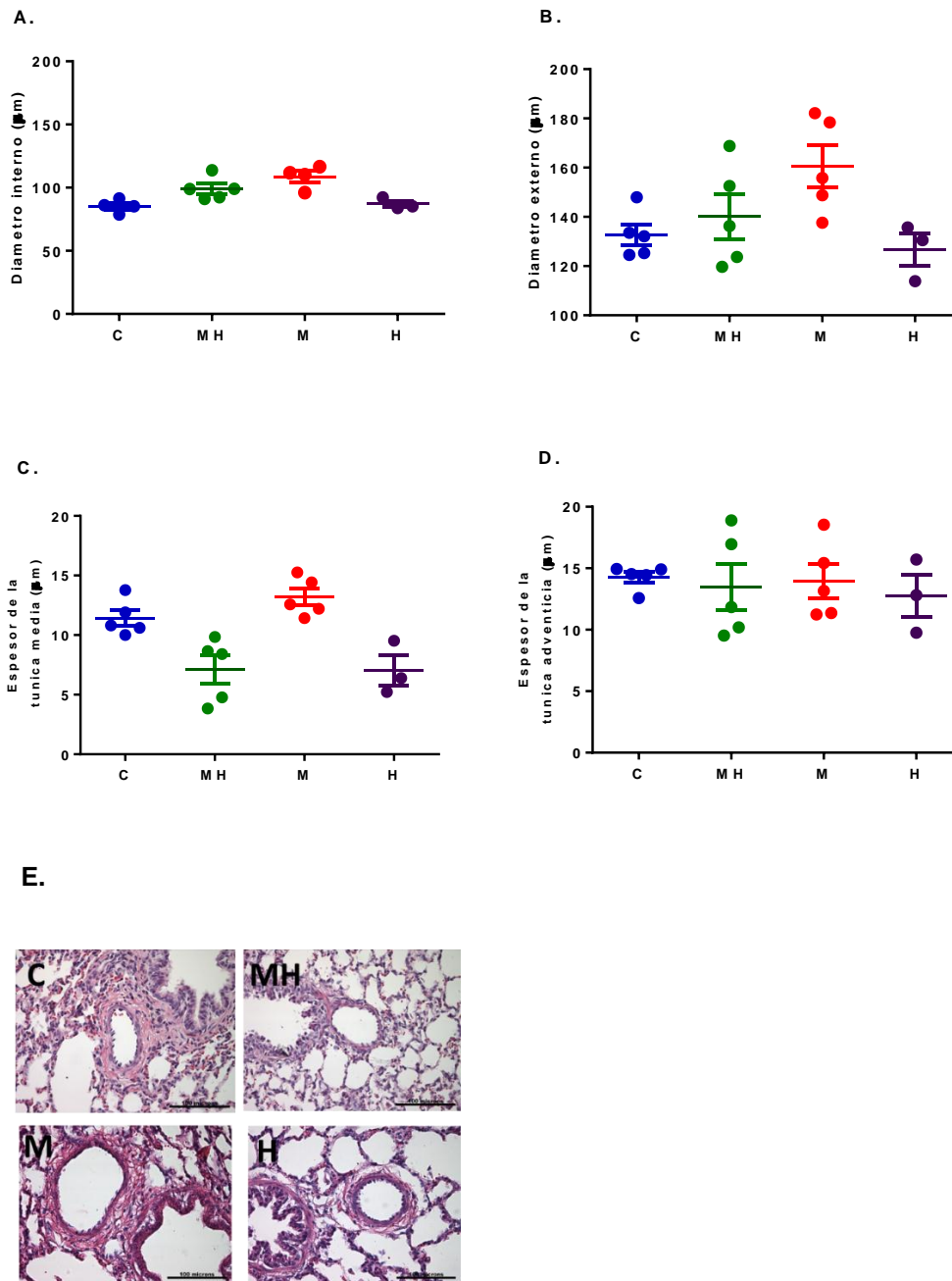


Figura 44. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar I. A) Diámetro interno, B) Diámetro externo, C) Espesor de la capa media, D) Espesor de capa adventicia y E) imagen representativa. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Barra micrométrica en las fotos: 100 µm. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

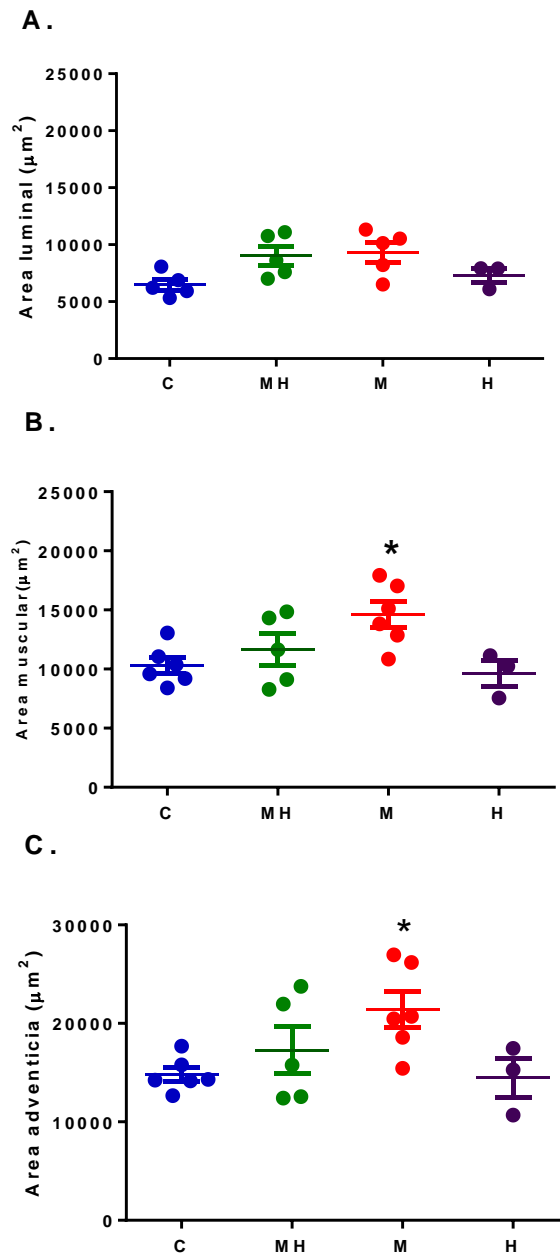


Figura 45. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar II. A) Área luminal, B) Área muscular y C) Área adventicia. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

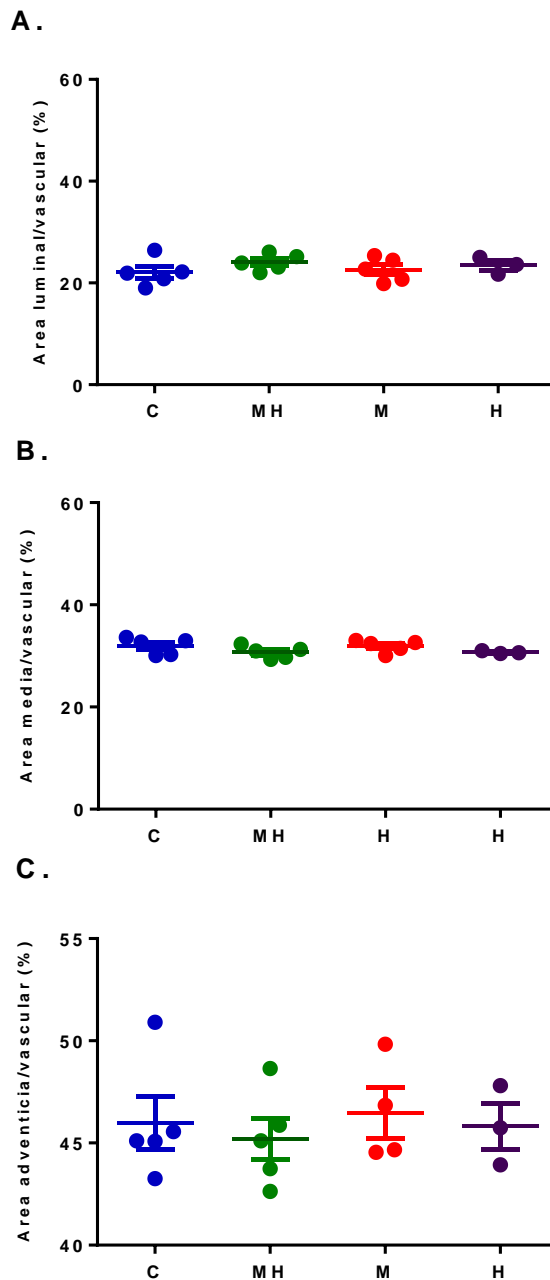


Figura 46. Histomorfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar III. A) Área luminal/ Área vascular %, B) Área media/ Área vascular % y C) Área adventicia / Área vascular. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Tukey para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

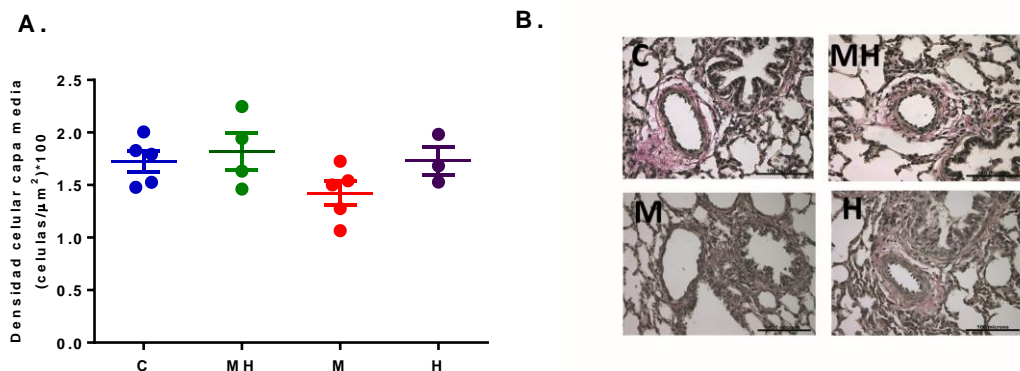


Figura 47. Densidad celular de la capa media en arterias de resistencia pulmonar. A) Densidad celular capa media y B) Imagen representativa de la cuantificación. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Barra micrométrica en las fotos: 100 μ m. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

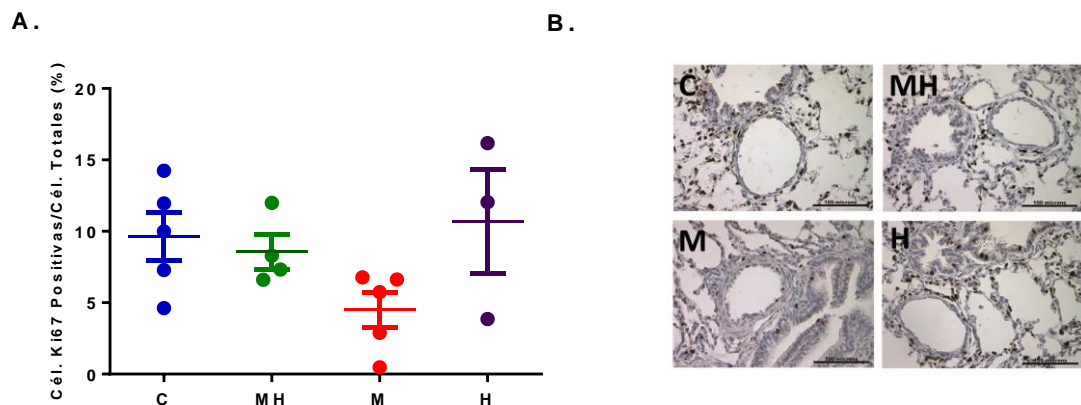


Figura 48. Proliferación celular en arterias de resistencia pulmonar. A) Porcentajes de células Ki67 positivas en arterias de resistencia pulmonar y B) Imagen representativa de la cuantificación. Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet para el análisis, los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Los grupos son: control (C, azul, n=6), tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y tratado con hemina (H, morado, n=3). Barra micrométrica en las fotos: 100 μ m. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

Objetivo Especifico 6. Determinación de las variables farmacocinéticas

Las concentraciones basales de melatonina en plasma no difirieron significativamente durante el estudio (antes de la melatonina oral = $85,13 \pm 18,20$ pg/ml para el grupo C y $92,65 \pm 12,50$ pg/ml para el grupo M). El perfil farmacocinético obtenido se presenta en la Figura 49.

La concentración basal de fierro como medida de la inducción del sistema hemoxigenasa no mostró diferencias significativas en los grupos tratados con hemina-melatonina ($0,26 \pm 0,03$ ng/dl) y con hemina ($0,28 \pm 0,05$ ng/dl). El perfil farmacocinético de bilirrubina obtenido se observa en la Figura 50.

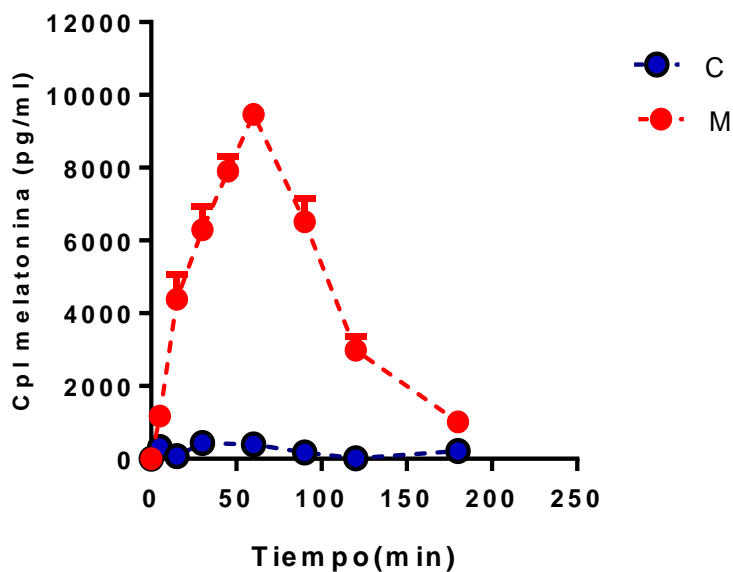


Figura 49. Perfil farmacocinético de melatonina. Perfil farmacocinético de la melatonina administrada oralmente a dosis diarias de 1 mg/Kg. Los datos representan el promedio de las concentraciones plasmáticas (Cpl) de melatonina medidas en los tiempos correspondientes para el grupos control (C, azul, n=5) y melatonina (M, rojo, n=5).

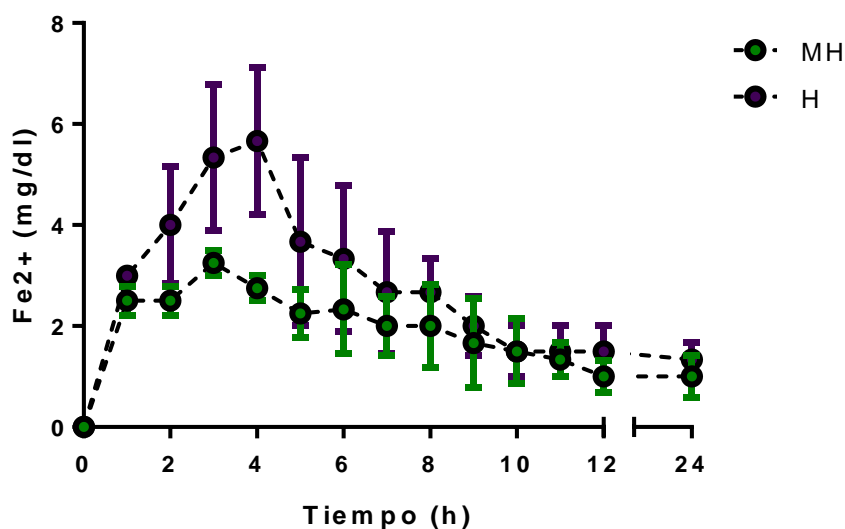


Figura 50. Perfil farmacocinético de Hemina. Perfil farmacocinético de la administración de hemina vía subcutánea de 10 mg/ Kg. A) Los círculos verdes representan el promedio de las concentraciones plasmáticas (Cpl) de hierro medidas en los tiempos correspondientes en el grupo melatonina-hemina (MH, verde, n=5) y B) Los círculos morados representan el promedio de las concentraciones plasmáticas (Cpl) de hierro medidas en los tiempos correspondientes en el grupo hemina (H, morado, n=3).

Tabla 3. Resumen de las Variables Farmacocinéticas obtenidas desde una administración oral de melatonina.

Variables: Farmacocineticas Dosis oral 1mg*Kg ⁻¹ .	
t _{max} (min)	57.0 ± 6.0
C _{max} (pg ml ⁻¹)	9374 ± 558
Half Time (min)	70.1 ± 5.2
AUC ₀₋₁₈₀ (pg ml ⁻¹ min ⁻¹)	802498 ± 91546
bioavailability (%)	42.9 ± 12.3

Tabla 4. Resumen de las Variables Farmacocinéticas obtenidas desde una administración subcutánea de hemina.

Variables Farmacocineticas	HM	H
t_{\max} (h)	3,11 ± 0,10	4,05 ± 0,53
C_{\max} (mg dl ⁻¹)	3,25 ± 0,41	5,66 ± 0,89
Half time (h)	5,59 ± 1,1	4,98 ± 0,22
AUC 0-24h (mg dl ⁻¹ h ⁻¹)	36,58 ± 8,98	53,05 ± 10,11

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

Variables biométricas

El análisis biométrico del peso corporal muestra que todos los animales de los diferentes grupos experimentales poseen una tendencia de ganancia de peso positiva y similar entre ellos (Figura suplementaria 1). Al ajuste de la regresión lineal, todos los grupos presentaron una correlación significativa, sin diferencias entre ellos, ni tampoco en las pendientes (Figura suplementaria 1B y C). La distancia cabeza-cola representa la talla de los animales, en la cual se observa que todos los grupos experimentales poseen un aumento de talla durante los días postnatales (Figura suplementaria 2A), con una correlación significativa de la talla con la edad (Figura suplementaria 2B). Sin embargo el grupo H posee un crecimiento menor en comparación al grupo control (Figura suplementaria 2C).

Para evaluar el crecimiento de la cabeza y la proporcionalidad de esta, se determinó el diámetro biparietal (DBP) en función de la edad (Figura suplementaria 3A y B), donde todos los grupos presentaron una correlación significativa con una pendiente (tasa de cambio) similar (Figura suplementaria 3). Finalmente la variable biométrica DA aumentó en función de los días postnatales en todos los grupos experimentales (Figura suplementaria 4A y B). La tasa de cambio diaria de esta variable demostró que el grupo MH disminuyó y el grupo M aumentó significativamente en comparación al grupo control (Figura suplementaria 4C).

Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

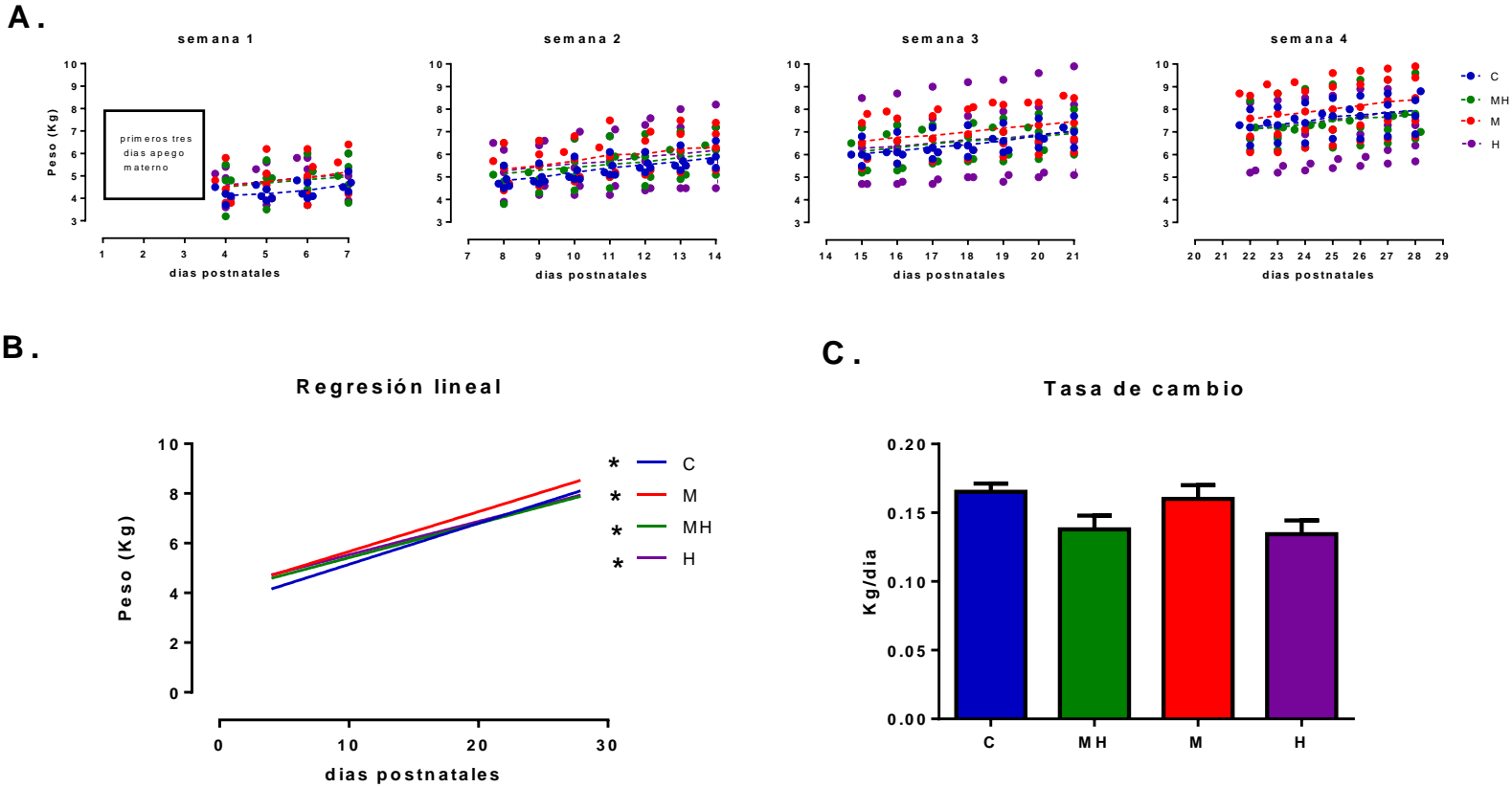
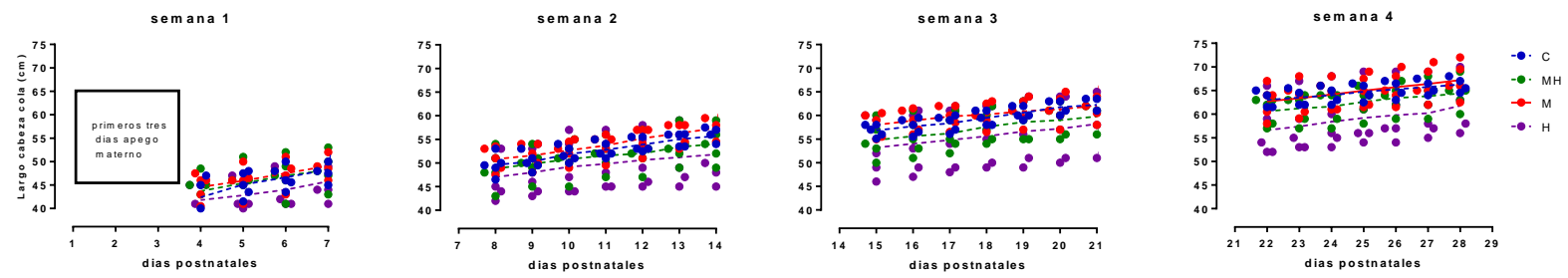


Figura 51. (Suplementaria 1). Peso corporal. Variable biométrica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo del peso (Kg), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

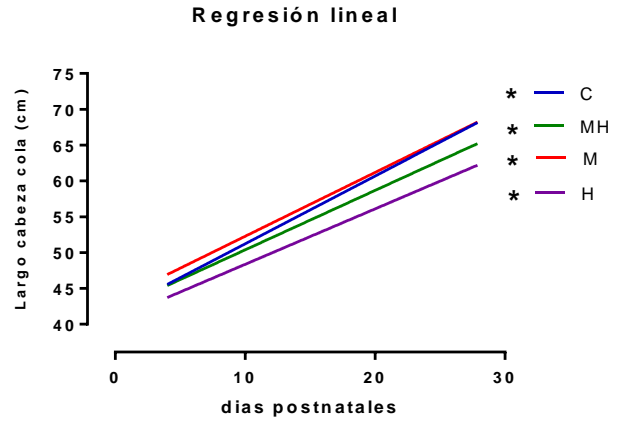
Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

A.



B.



C.

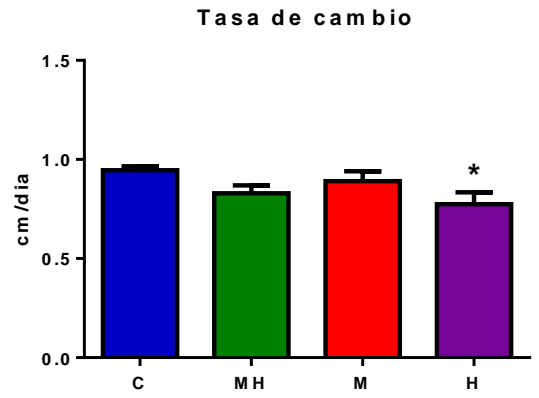
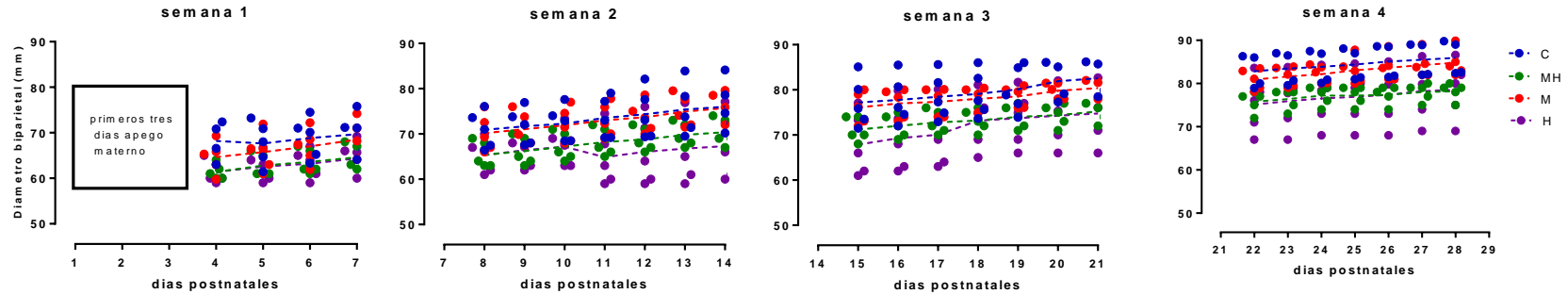


Figura 52 (suplementaria 2). Largo cabeza-cola. Variable biométrica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo del largo cabeza-cola (LCC), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C

Ventana Terapéutica Farmacológica

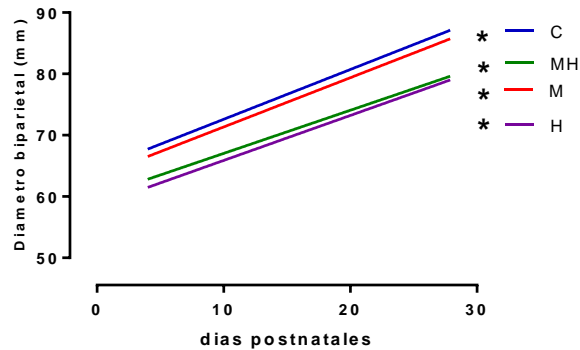
Sin tratamiento

A.



B.

Regresión lineal



C.

Tasa de cambio

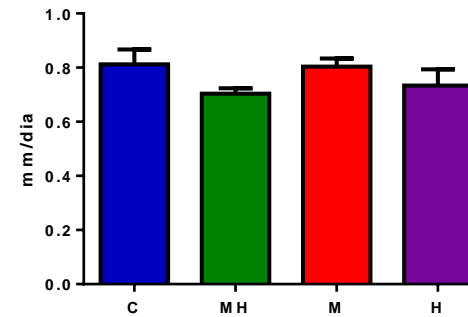
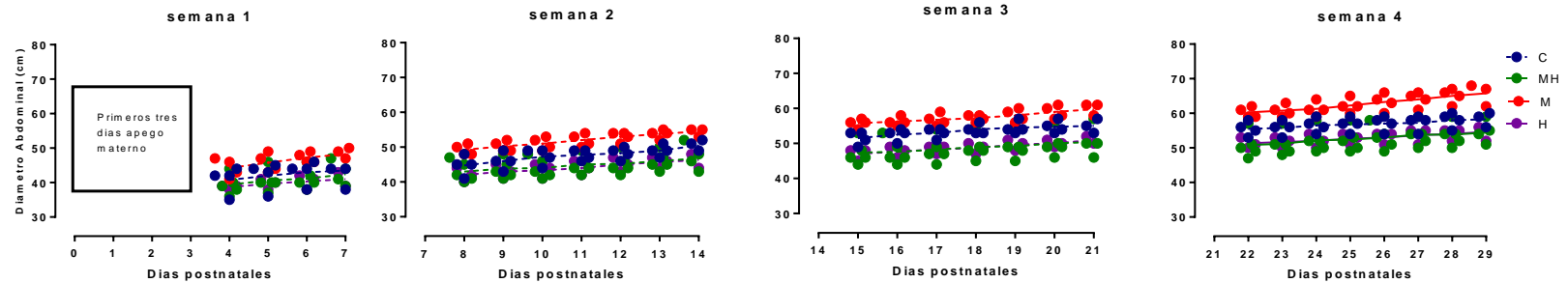


Figura 53 (suplementaria 3). Diámetro biparietal. Variable biométrica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo del diámetro biparietal (DBP), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

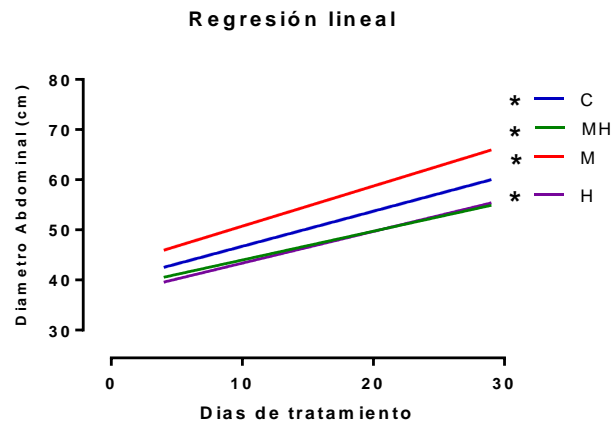
Ventana Terapéutica Farmacológica

Sin tratamiento

A.



B.



C.

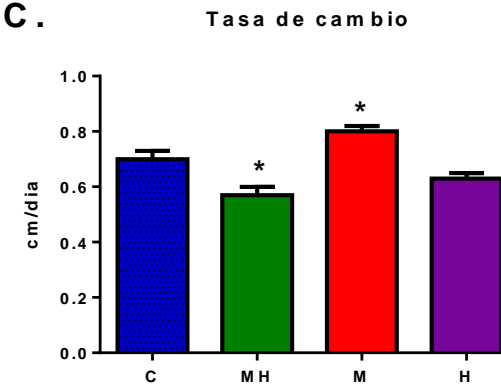


Figura 54 (suplementaria 4). Diámetro abdominal. Variable biométrica medida durante el periodo de experimentación. A) Registro continuo del diámetro abdominal (DA), B) Ajuste lineal y análisis de correlación durante el periodo de experimentación y C) Tasa de cambio asociada a cada tratamiento. Grupo control (C, azul, n=5), grupo tratado con melatonina-hemina (MH, verde, n=5), grupo tratado con melatonina (M, rojo, n=5) y grupo tratado con hemina (H, morado, n=3). Todos los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

DISCUSIÓN

Las estrategias experimentales propuestas en esta tesis utilizaron agentes antioxidantes y antirremodelante de manera individual y combinada, como terapias farmacológicas para el tratamiento de la hipertensión pulmonar del neonato (HPN). En este sentido, se administró hemina en dosis única diaria de 10 mg/Kg y melatonina en dosis única diaria de 1mg/Kg, con la finalidad de aumentar los mecanismos vasodilatadores, disminuir el remodelamiento arterial y mejorar el tono oxidativo a nivel pulmonar, para revertir el cuadro clínico de la HPN (Steinhorn y cols, 2010).

Esta tesis demostró que el tratamiento MH logró revertir la disfunción arterial pulmonar *ex vivo* e *in vitro* y mejoró el tono oxidativo pulmonar *in vitro*. Sin embargo, estos efectos no lograron traducirse en una disminución de la PAPm o RVP como objetivo principal en el modelo estudiado. Una posible explicación es que, a pesar de los diferentes mecanismos de acción de melatonina y hemina, el estímulo hipóxico a nivel pulmonar generó una respuesta contraria (vasoconstrictora) que, en el balance vasoactivo final *in vivo*, no generó cambios significativos en comparación al grupo C.

Uno de los responsables de este fenómeno vasoconstrictor es la modulación por la hipoxia de los canales de potasio, en particular los dependientes de voltaje (Kv) en especial las isoformas Kv 1,5 y Kv 2,1 (Dunham-Snary y cols, 2017). Existe evidencia de que el estímulo hipóxico produce una inhibición de estos canales, generando cambios en el potencial eléctrico de células musculares lisas, lo que genera un aumento de la sensibilidad de apertura de

canales calcio dependiente de voltaje (canales de tipo L). Esto aumenta la entrada de calcio intracelular y genera la vasoconstricción hipóxica (Dunham-Snary y cols, 2017).

En relación con las terapias individuales, el grupo tratado con M logró disminuir la PAPm de forma aguda (día 5 de tratamiento), efecto ya descrito en este mismo modelo (Torres y cols, 2015). Los mecanismos involucrados en esta respuesta fueron una mejora en el tono oxidativo pulmonar y una mayor vasodilatación dependiente de endotelio (oxidonitrérgica y prostanoide). Por otro lado, el grupo H no modificó su PAPm durante el periodo analizado. Aunque, existen antecedentes que indican que un tratamiento de 15mg/Kg de hemina durante 10 días logró disminuir la PAPm activando mecanismos vasodilatadores dependientes de cGMP e inhibiendo la entrada de calcio vía BKCa (Ebensperger G, 2011). Sin embargo, en este trabajo no pudimos replicar dichos efectos. Es más, en nuestro estudio, hemina empeoró la función cardiopulmonar una vez retirado el tratamiento, aumentando la RVP y la PAPm. Estos resultados sugieren que los mecanismos por los cuales hemina genera una vasodilatación y un remodelamiento no son suficientes en el largo plazo para contrarrestar la vasoconstricción hipóxica a nivel pulmonar (*setting* hipóxico).

La inducción de las hemoxigenasas genera bilirrubina la cual tiene propiedades antioxidantes (Zibera y cols, 2016), lo que tendería a favorecer a una caída del estrés oxidativo pulmonar. Sin embargo, si el entorno celular tiene un estrés oxidativo basal asociado a la hipoxia ambiental, la

administración de hemina (protoporfirina IX con un átomo de Fe^{3+}) también puede comportarse como una molécula prooxidante y contribuir a la vasoconstricción mediada por ROS (Sylvester y cols, 2012), contrarrestando el efecto vasodilatador y antirremodelante asociado al CO.

En relación con las variables cardíacas analizadas en esta tesis como el GC y la FC, existe una disminución transitoria del GC, la que se normalizó al finalizar el período experimental. Por otro lado, la PAS y la RVS no registraron cambios durante los tiempos analizados. Tanto melatonina como hemina fueron administradas por vías que requieren del sistema circulatorio para llegar al órgano blanco, por lo que es deseable la mantención de las variables sistémicas en rangos fisiológicos normales. A la vez, estos neonatos no tienen grandes diferencias en la circulación sistémica al ser comparados con sus equivalentes de tierras bajas (Herrera y cols, 2007; Herrera y cols, 2008). Es deseable que un tratamiento administrado con un blanco pulmonar no tenga efectos en la circulación sistémica o en otros órganos que funcionan dentro de rangos fisiológicos. Por lo tanto, las dosis administradas en esta tesis lograron tener un efecto a nivel pulmonar con un efecto menor en el sistema circulatorio sistémico-periférico o la función cardíaca.

La HPN se caracteriza por presentar una vasorreactividad pulmonar anormal, tendiendo a la vasoconstricción en especial en arterias de resistencia, como lo demuestran estudios previos (Herrera y cols, 2007; 2008; 2010; Torres y cols, 2015; Lopez y cols, 2016; Gonzalez-Candia y cols, 2019). Lo anterior se explica, debido a una disfunción endotelial con disminución de la capacidad

vasodilatadora del músculo liso vascular. Esto lleva a una disminución de los mecanismos vasodilatadores y a un aumento de los mecanismos vasoconstrictores, generando un elevado tono vasoconstrictor a nivel vascular (Dakshinamurti y cols, 2005).

Esta vasorreactividad se evaluó *ex vivo* a través de la técnica de miografía de alambre en arterias pequeñas de resistencia, *e in vitro* a través de la expresión génica y proteica por RT-PCR y Western blot, respectivamente. El tratamiento MH aumentó la vasoconstricción inducida por potasio, independiente de receptor. Se ha descrito que la hipoxia genera un aumento de la respuesta a potasio y por lo tanto la capacidad contráctil en el lecho vascular pulmonar (Herrera y cols, 2007). Este efecto se debe principalmente a que aumenta el número de células de músculo liso en la capa media vascular. Sin embargo, como se describe en esta tesis no hay cambios morfo estructurales en el espesor de la capa media de las arterias pequeñas de resistencia pulmonares analizadas, por lo que una opción es que melatonina y/o hemina generen una expresión diferencial de canales de potasio aumentando su número por unidad celular. En base a esta suposición existe evidencia experimental en la cual melatonina es capaz de regular la expresión de manera diferencial de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) en células tumorales MCF-7 (Squecco y cols, 2015) y hemina en líneas celulares tumorales K562 (Min Seok Song y cols, 2016).

Cuando se analizó la vasoconstricción asociada a receptor, la primera vía estudiada en esta tesis fue la relacionada a serotonina (5HT). Esta vía es importante en la HPN, pues contribuye al fenotipo vasoconstrictor asociado a la hipoxia crónica (Launay y cols, 2012). De hecho, la activación de los receptores de 5HT induce vasoconstricción, proliferación de células musculares lisas e inhibición de canales de potasio dependientes de voltaje (Morecroft y cols, 1999; Hood y cols, 2017). El tratamiento MH indujo una disminución en la expresión del receptor 5HT 2B en tejido pulmonar; sin embargo el efecto *ex vivo* no mostró diferencias significativas en la vasoconstricción máxima y sensibilidad. Esta inconsistencia radica en que la disminución en la expresión del receptor 5HT 2B no es suficiente para contrarrestar la contribución que tienen los receptores 5HT 2A, 1B/D o el transportador de serotonina 5HTT en la generación de la vasoconstricción mediada por serotonina en el lecho pulmonar (MacLean, 2018).

La respuesta *ex vivo* a endotelina-1 en las arterias pequeñas de resistencia pulmonares no mostró diferencias significativas en la vasoconstricción máxima en el grupo MH, aunque se observó una tendencia clara en la disminución de esta vasoconstricción. Por otro lado, el grupo M disminuyó significativamente la vasoconstricción máxima. Existe evidencia que la administración de melatonina en un modelo de cáncer de colon fue capaz de inhibir la síntesis de endotelina-1 vía *edn-1* mRNA (primer paso en la biosíntesis de endotelina-1) a través de la inhibición de Foxo-1 y NF- κ B (Leon y cols, 2014). En el análisis *in vitro* de la expresión de los receptores de endotelina en tejido pulmonar, no se encontraron cambios en la expresión del

receptor ETa de endotelina en todas las terapias utilizadas, este receptor se ubica principalmente en musculo liso e induce vasoconstricción (Houde y cols, 2016). En contraste, en el grupo tratado con M se observó un aumento en la expresión del receptor tipo b de endotelina (ETb) en tejido pulmonar, el cual tiene su localización a nivel endotelial principalmente. ETb induce vasodilatación estimulando la liberación de óxido nítrico o la activación de la vía prostanoide a través de la fosfolipasa C (PLC) en el endotelio (Dhaun y cols, 2019).

Finalmente, la vía vasoconstrictora dependiente de tromboxano fue evaluada *ex vivo*, donde el tratamiento MH no tuvo efectos. Esto fue complementado con la cuantificación de la expresión del receptor de tromboxano (Tp), el cual no mostró cambios en su nivel de expresión en tejido pulmonar a nivel de mensajero o de proteína. El grupo M disminuyó la vasoconstricción máxima inducida por TX, sin cambios ni en la expresión del receptor Tp ni en la sintasa. Una explicación para este resultado puede radicar en la dicotomía de los tejidos usados en ambas técnicas, ya que para los estudios *ex vivo* se utilizaron arterias pequeñas de resistencia, en cambio para los resultados *in vitro* se utilizó tejido pulmonar completo, incluyendo todas las poblaciones celulares del parénquima pulmonar, como los bronquiolos, los cuales tienen la capacidad de expresar la vía dependiente de tromboxano en su músculo liso (Hernandez y cols, 2015).

El estudio de la relajación dependiente de endotelio en arteria de resistencia pulmonar se realizó a través de la estimulación *ex vivo* por metacolina (análogo de acetilcolina). Este diseño experimental permite demostrar si las terapias farmacológicas son capaces de mejorar la vasodilatación dependiente de endotelio, la cual se encuentra disminuida en este modelo experimental asociado a hipoxia crónica (Herrera y cols 2007; 2008; Torres y cols, 2015). El grupo tratado MH aumentó la vasodilatación máxima asociada a metacolina. Esta droga estimula la liberación de calcio a nivel endotelial a través de la activación de receptores muscarínicos, desencadenando la vasodilatación dependiente de endotelio. La activación endotelial induce mecanismos vasodilatadores dependientes e independientes de óxido nítrico.

Cuando se realizó el análisis de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en tejido pulmonar, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. Sin embargo, la actividad de la eNOS puede haber aumentado o el óxido nítrico presentar una mayor biodisponibilidad al haber disminuido el estrés oxidativo (Tabima y cols, 2012; Torres y cols, 2015). Se ha descrito que, bajo estrés oxidativo, la eNOS sufre reacciones de oxidación que la monomerizan, principalmente por la oxidación de la tetrahidrobiopterina (BH₄), cofactor crítico para el adecuado funcionamiento de la enzima, ya que es uno de los sustratos necesarios para que se realice la transferencia de electrones desde la L-arginina hacia el sitio activo de la enzima (Poulos y cols, 2017).

La función de la eNOS como monómero en lugar de dímero se denomina desacople de la eNOS, disminuyendo de esta manera la generación de óxido nítrico y además contribuyendo a la generación de anión superóxido (Tabima y cols, 2012; Zhang y cols, 2018). Por lo tanto, un menor tono oxidativo celular pulmonar mejora la función vasodilatadora dependiente de endotelio como se observó en el grupo MH.

Con respecto a la vasodilatación independiente de óxido nítrico analizada en esta tesis, se realizó un estudio de la vasorreactividad *ex vivo*, activando el endotelio con metacolina pero esta vez inhibiendo la eNOS con L-NAME. El grupo MH mostró un aumento de la vasodilatación máxima endotelial con bloqueo oxidonitrérgico. Una de las vías que puede estar contribuyendo a este efecto vasodilatador es la asociada al CO, pues la administración farmacológica propuesta en esta tesis logró inducir el sistema de las hemoxigenasas (HO-1 y HO-2) en tejido pulmonar como se demostró en el análisis por western *blot*.

La inducción del sistema mediado por CO tiene como efector a la célula de músculo liso, activando la guanilato ciclasa soluble (sGC) y aumentando la concentración intracelular de cGMP. A su vez, el cGMP activa a su efector, la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), que aumentó su expresión en tejido pulmonar en el grupo MH. Interesantemente, la expresión de PKG corresponde al efector final de la vía NO-GMPc-PKG-1, estimulando la inhibición de la fosforilación de la proteína cadena ligera de miosina (MLC). Esto genera una inhibición de la interacción de la miosina con actina

provocando una vasodilatación en las células de músculo liso pulmonar dependiente de cGMP (Chatterjee y cols, 2008; Fadel, 2017).

Otro mecanismo por el cual el CO puede inducir una vasodilatación independiente de óxido nítrico es la mediada por la activación de canales de potasio de alta conductancia sensibles a calcio (BKCa). El CO es capaz de activar estos canales, generando una disminución en la entrada de calcio gatillada por voltaje, disminuyendo el Ca^{+2} intracelular y generando vasodilatación en células de músculo liso (Roth y cols, 2009). A pesar de haber encontrado un aumento en la expresión de estos canales, no existen mecanismos descritos en la literatura que mencionen a melatonina o hemina como inductores de la expresión de estos canales. Estos canales son moduladores de la vasoconstricción hipóxica pulmonar (Roth y cols, 2009), por lo que mayores estudios debiesen apuntar a descubrir los potenciales mecanismos por los cuales melatonina y hemina podrían estar induciendo su expresión.

Otro mecanismo que estaría contribuyendo a la vasodilatación independiente de endotelio es el mediado por prostaglandinas. Nuestros hallazgos muestran que el grupo MH aumentó la expresión de la prostaglandina sintasa (PGIs) y el receptor de prostaciclina I_2 (Ip), sin cambios en la expresión de la vía prostanoide vasoconstrictora (tromboxano sintasa, TXs) y receptor de tromboxano (Tp). De estos resultados, se infiere un balance hacia un tono vasodilatador dependiente de prostanoide a nivel pulmonar, asociada a la vía dependiente de cAMP-PKA (Del Pozo y cols, 2017).

Actualmente no existe evidencia directa en la cual melatonina o el CO logren una modulación o activación de la vía vasodilatadora dependiente de prostaciclina I₂. Sin embargo, existe evidencia experimental en la cual melatonina induce el factor transcripcional proteína activadora 1 (AP-1) (Koçtürk y cols, 2019). AP-1 activado puede migrar hacia el núcleo celular e inducir la expresión de genes, en particular a la región promotora del receptor de prostaciclina I_p (Eivers y cols, 2016). Este mecanismo propuesto es mediado por la activación de los elementos de respuesta a cAMP (CREB), asociado a la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), mediado por el receptor de melatonina MT1 (Jockers y cols, 2008). A la vez, el monóxido de carbono podría inducir la vía relacionada con prostaciclina, existiendo una referencia que la inducción del sistema hemoxigenasa favorece la vasodilatación dependiente de prostaglandinas vasodilatadoras en el cerebro (Horváth y cols, 2008).

Uno de los factores principales en la génesis de la HPN es el estrés oxidativo generado por la disminución de oxígeno (Clanton, 2007). Los principales sistemas involucrados en la generación de estrés oxidativo a nivel vascular son: la mitocondria, la xantina oxidasa, eNOS desacoplada y NADPH oxidasa (Tabima y cols, 2012). Esta tesis cuantificó la activación del sistema NADPH oxidasa, tomando en cuenta el nivel de expresión de la razón subunidad p47phox en citoplasma/membrana plasmática y la cuantificación de la fosforilación activadora de la sub p47phox en tejido pulmonar. Aunque el tratamiento con MH mostró una clara tendencia a una menor traslocación que

el grupo C, el grupo tratado con M mostró una razón menor significativa en comparación al grupo C.

La relevancia de este resultado radica en que la subunidad p47phox tiene que translocarse hacia la membrana plasmática para su activación. Además, esta debe fosforilarse en Ser370 para poder tener una conformación activa y ensamblarse con las subunidades gp91phox y p22phox (Belambri y cols, 2018). El grupo MH solo mostró una tendencia en la disminución de la fosforilación activadora en comparación al grupo C, sin embargo, las terapias individuales M y H mostraron una diferencia significativa en la disminución de la fosforilación en Ser370 de la subunidad p47phox. A pesar de que no se midió la generación de anión superóxido *in vitro* por el complejo NADPH oxidasa en esta tesis, estos resultados son extrapolables a una menor activación de este sistema. La relevancia de estos resultados radica en que en el cuadro de la HPN, el sistema de la NADPH oxidasa se encuentra inducido por la hipoxia vía aumento del calcio intracelular y la activación de la isoforma ϵ PKC (Bedard y cols, 2007), la cual es capaz de fosforilar a la subunidad p47phox en membrana plasmática y activarla (Filip-Ciubotaru y cols, 2016). Aunque no se ha descrito una modificación directa de melatonina en el complejo proteico de la NADPH oxidasa, una opción es que melatonina a través de sus propiedades *scavenger* sea capaz de bajar el estrés oxidativo celular y de esta manera inactivar al sistema de proteínas pequeñas de unión a GTP (Rac) en particular a Rac 1. Esta sugerencia se basa en que las Rac se activan por estrés oxidativo (Koshkin y cols, 2006). Además, melatonina es capaz de disminuir la generación de anión superóxido provenientes de la

NADPH oxidasa en tejido pulmonar *in vitro* en un modelo de hipertensión pulmonar neonatal asociado a hipoxia crónica (Gonzalez-Candia y cols, 2019).

Por otro lado, la administración de hemina y la inducción del sistema hemoxigenasa además de generar CO e ion ferroso, produce bilirrubina. A esta última se le ha descrito un efecto supresor en la generación de anión superóxido generado por la NADPH oxidasa en células endoteliales humanas (Jiang y cols, 2006). De hecho, estudios corroboran este efecto en los cuales altas concentraciones de bilirrubina inhiben la fosforilación de la subunidad p47phox dependiente de ϵ PKC inactivando el ensamblado de la NADPH oxidasa en membrana plasmática (Miralem y cols, 2012).

Otra fuente pro-oxidante analizada en esta tesis fue la actividad de la enzima xantina oxidasa (XO). Si bien solo existió una tendencia clara en la disminución en la actividad de la XO en los grupos MH y M, en el grupo H existió una disminución significativa en la actividad de la XO en comparación al grupo C. El sistema xantina oxidoreductasa es parte del metabolismo de las purinas a nivel celular, que bajo condiciones de estrés oxidativo existe una conversión del sitio catalítico de la enzima, el cual dona electrones al oxígeno molecular, produciendo de ese modo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y $\bullet O_2^-$ (Tabima y cols, 2012). Sin embargo, aún no existe evidencia en la cual melatonina o hemina (vía CO) sean capaces de modificar el sitio catalítico de la enzima y restaurar el flujo de electrones hacia el NAD^+ (forma deshidrogenasa) disminuyendo de esta manera la generación de estrés

oxidativo por este complejo enzimático. Un mecanismo alternativo sería al modificar el entorno celular hacia un estado menos oxidante, donde la forma predominante de la enzima sería la deshidrogenasa. Esto sería factible según los hallazgos de esta tesis, donde se evidencia una disminución del estrés oxidativo en el grupo MH, demostrado por una disminución de los 8-isoprostanos como marcador de lipoperoxidación y nitrotirosina como marcador de estrés nitrosativo.

La terapia combinada utilizada en esta tesis usó melatonina y hemina como agentes antioxidantes directos o inductores de la maquinaria antioxidante.

En este sentido, se han demostrado ampliamente los efectos antioxidantes de melatonina en diversos tejidos (Karaaslan y cols, 2015). Los mecanismos involucrados en sus efectos antioxidantes dan cuenta en primer lugar su capacidad de *scavenger* que tiene esta molécula, que es capaz de acuerdo con su estructura química unirse a diferentes ROS, generar intermediarios estables y de esta forma disminuir la biodisponibilidad celular de ROS a nivel celular (Galano A y cols, 2018). Por otro lado, el mecanismo descrito de melatonina como inductor de la maquinaria antioxidante enzimática está mediada vía receptor MT1 (receptor acoplado a proteína G) acoplado a G_i. La activación de MT1 estimula la inhibición de la fosfolipasa aumentando los niveles de cAMP y activando a la proteína dependiente de cAMP (PKA). PKA fosforila y activa a las proteínas de respuesta a cAMP (CRE) activando su migración nuclear en regiones promotoras de las enzimas antioxidantes (Oishi y cols, 2018) aumentando su expresión a nivel celular. Esto es respaldado por

datos experimentales del Laboratorio, demostrando que melatonina es capaz de inducir la maquinaria antioxidante enzimática en pulmón asociada a un aumento en la expresión y actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa 1 (Gpx-1) (Torres y cols, 2015). Además, melatonina en tejido pulmonar fue capaz de modular de manera negativa la producción de anión superóxido de las principales fuentes generadoras de ROS a nivel celular (Gonzalez-Candia A y cols, 2019). Así, la administración prenatal de melatonina logró disminuir la generación de anión superóxido de origen mitocondrial, NADPH oxidasa y xantina oxidasa en tejido pulmonar.

Por otro lado, la administración de hemina también puede generar un efecto antioxidante vía inducción de las hemoxigenasas, las cuales como se ha descrito anteriormente, generan como producto de la reacción: CO y cantidades equimolares de biliverdina, la cual pasa a través de la enzima biliverdina reductasa a bilirrubina, molécula que también posee una importante capacidad antioxidante (Fredenburgh y cols, 2007). La bilirrubina y la biliverdina tienen la capacidad de tener un efecto *scavenger* de ROS asociado a sus estructuras químicas. En base a esto, se ha demostrado un efecto protector de bilirrubina en líneas endoteliales humanas, en las cuales se les ha inducido estrés oxidativo produciendo disfunción endotelial. Además, estos estudios demostraron una relación inversa entre la disfunción endotelial y la concentración intracelular de bilirrubina, infiriendo una función protectora de la bilirrubina en relación con el daño oxidativo (Ziberna y cols, 2016).

Finalmente, un sistema que regula el tono oxidativo celular es el mediado por el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Este factor regula la expresión de numerosos genes relacionados con la respuesta antioxidante, mediante su unión a una secuencia específica del DNA conocida como la región de unión de elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Krajka-Kuźniak y cols, 2017), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa (Taguchi y cols, 2017). La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplasmática llamada Keap1 (de sus siglas en inglés *Kelch-like ECH-associating protein 1*). Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 vía proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de *ново* (Malhotra y cols, 2010). Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 constituye un sensor del tono oxidante celular, y sería uno de los mecanismos que se activaría por el estrés oxidativo asociado a hipoxia crónica. Aunque esta tesis no realizó una cuantificación de la expresión de la proteína Nrf2, existe evidencia en la cual melatonina es capaz de inducir su activación y potenciar de esta manera la inducción de la maquinaria antioxidante celular en pulmón (Torres y cols, 2015). Si bien el mecanismo no está dilucidado, si se ha demostrado una asociación positiva entre la administración de melatonina y la inducción del sistema Nrf2 en modelos de estrés oxidativo asociados a citoestáticos (Ulkan Kilic y cols, 2013).

En relación con los cambios estructurales en el parénquima pulmonar analizados en esta tesis, el tratamiento MH no generó cambios significativos

en los espesores ni en las áreas analizadas. Sin embargo, la evidencia señala que melatonina, en dosis de 1 mg/Kg, es capaz de producir cambios estructurales pulmonares en un modelo de HPN (Torres y cols, 2015). Por otro lado, hemina posee una capacidad antirremodelante documentada en varios modelos experimentales (Jeon y cols, 2009). En base a esto, estudios previos del Laboratorio demostraron que dosis de 15 mg/Kg de hemina revierte el remodelamiento cardíaco derecho y provoca una disminución de la capa media en arterias pequeñas pulmonares de resistencia en el modelo de HPN por hipoxia crónica (Ebensperger, 2011).

En el caso de melatonina, a pesar de que los receptores a nivel pulmonar no fueron cuantificados, estudios previos han demostrado que melatonina es capaz de llegar a pulmón como órgano blanco en un amplio rango de dosis (0,1-100 mg/Kg) (Andersen y cols, 2016). Además, en el Laboratorio hemos demostrado la presencia de MT1 y MT2 en pulmón de corderos (Villanueva C, 2015). Los estudios anteriormente descritos evaluaron la respuesta al tratamiento (en términos moleculares y estructurales) mientras aún se mantenía el efecto de dicho tratamiento. En contraste, esta Tesis intento replicar lo que sucede en un escenario clínico y evaluar la persistencia de los efectos del tratamiento una vez retirado este. En este sentido, es posible que los tratamientos hayan inducido mayores cambios en la función, estructura y tono oxidativo cardiopulmonar, pero que, al evaluarlos al menos una semana después de terminado el tratamiento, estos efectos estén en franca reversión. Esta es una alternativa que queda pendiente por evaluar en futuros estudios. Por el momento, los tratamientos no fueron capaces de revertir en el largo

plazo (después de retirado el tratamiento) el remodelamiento patológico inducido por hipoxia crónica.

Otra posible explicación es que las concentraciones de melatonina y/o hemina alcanzadas en el pulmón no sean suficientes para generar el efecto antioxidante a nivel celular, así como la reversión del remodelamiento patológico.

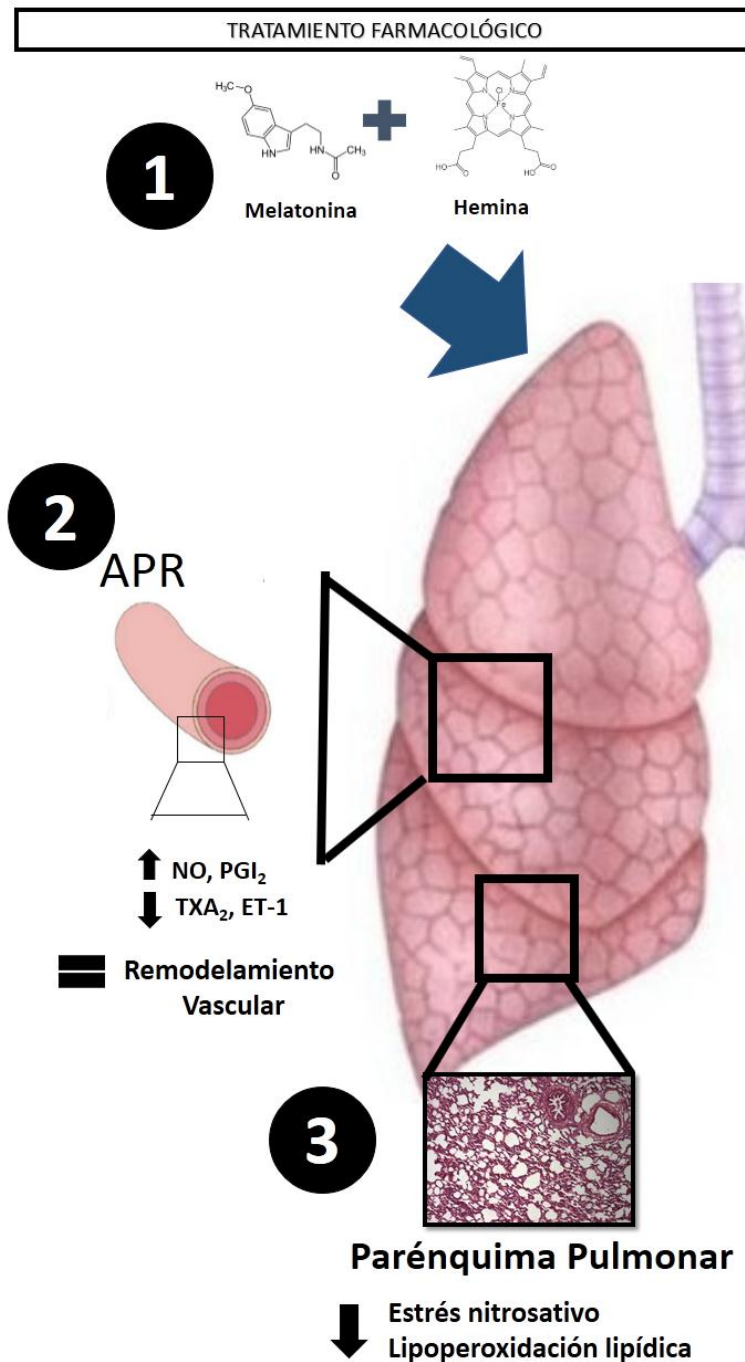


Figura 55. Esquema representativo de los hallazgos obtenidos. 1) Administración de la terapia farmacológica utilizada en esta tesis: melatonina oral y hemina subcutánea, 2) efecto en la vasorreactividad en arterias pequeñas de resistencia (APR), la terapia aumento la vasodilatación dependiente de NO y PGI₂ disminuyendo la vasoconstricción por tromboxano (TX) y endotelina 1 (ET-1) sin cambios estructurales en las APR y 3) La terapia disminuyó el estrés nitrosativo cuantificado por nitrotirosina y disminuyó el estrés lipídico cuantificado por la cantidad de 8-isoprostanos en tejido pulmonar.

En definitiva, la terapia combinada mejoró importantemente la vasorreactividad vascular y el estrés oxidativo pulmonar, sin embargo, no evidenció cambios estructurales en las arterias pulmonares de resistencia (Figura 52). Esto se asoció a una mantención en la PAPm y en la RVP. En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que ambos fármacos, de manera aislada o combinada, revierten parcialmente algunos aspectos de la HPN, pero no disminuyen la presión pulmonar, indicador diagnóstico de este síndrome. A pesar de esto, creemos que una mejora parcial en la función y reactividad vascular, además de una caída del estrés oxidativo, favorecería la adaptación del sistema cardiopulmonar en hipoxia de grandes altitudes. Por lo tanto, este tratamiento podría proponerse como coadyuvante al NO inhalatorio, siempre y cuando se diagnostique una HPN asociada a estrés oxidativo.

Conclusiones

- El tratamiento MH no logró compensar el estímulo hipoxico pulmonar, esto lo asociamos a los experimentos *in vivo* y al análisis morfoestructural en tejido pulmonar, en los cuales no se observaron cambios en relación al grupo C.
- En los experimentos *ex vivo*, el grupo tratado con MH mejoró la vasodilatación endotelial, por mecanismos dependientes e independientes de óxido nítrico, asociado a los efectos antioxidantes y vasodilatadores de melatonina y a la acción mediada por CO.
- El tratamiento MH, módulo el tono oxidante pulmonar, mejorando la capacidad antioxidante y disminuyendo la generación de estrés oxidativo en pulmón.
- Se cuantificó las concentraciones de melatonina y hemina con la finalidad de asociar efecto fisiológico a concentraciones de los fármacos utilizados.

BIBLIOGRAFIA

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

Abman SH. 2007. Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology.* 91: 283–290.

Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, et al. 2001. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 30(2): 65-74.

Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–51.

Alam J, Cook JL. 2007. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36:166-74.

Almeida AS, Figueiredo-Pereira C, Vieira HL. 2015. Carbon monoxide and mitochondria-modulation of cell metabolism, redox response and cell death. *Front Physiol.*

American Academy of Pediatrics. Committee on Fetus and Newborn. 2000. Use of inhaled nitric oxide. *Pediatrics.*106:344–5.

Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. 2016. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig.* 36(3):169-75.

Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT. 1998. Molecular identification of the role of voltage-gated K_p channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest.*101 (11):2319-2330.

Arendt J.2005. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman Hall. 201-205 London.

Asikainen TM, White CW. 2005. Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD. *Toxicol Appl Pharmacol.* 203:177–188.

Ayer A, Zarjou A, Agarwal B, Stocker V. 2016 Heme Oxygenases in Cardiovascular Health and Disease. *Physiol Rev.* 96(4): 1449–1508.

Baquero H, Soliz A, Neira F, Venegas ME, Sola A. 2006. Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: a pilot randomized blinded study. *Pediatrics.* 117:1077–83.

Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.*87:245–313.

Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J. 2018. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest.* 48; Suppl 2:e12951.

Bergeron M, Ferriero DM, Sharp FR.1998. Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res.* 105:181-94.

Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, et al. 2000. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*. 407, 870–876.

Briones A, Rhian M, Touyz M. 2010. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr Hypertens Rep*.12:135–142.

Brune B, Schmidt K, Ullrich V. 1990. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 192: 683-689.

Blood AB, Terry MH, Merritt TA, Papamatheakis DG, Blood Q, Ross JM, et al. 2013. Effect of chronic perinatal hypoxia on the role of rho-kinase in pulmonary artery contraction in newborn lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304:R136–R146.

Bradford JR, Dean HP. 1894. The pulmonary circulation. *J Physiol*. 16(1-2):34-110.

Bubenik GA. 2002. Gastrointestinal melatonin: localization function and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. 47(10): 2336-2348.

Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*. 109(2): 159–165.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 327:70–75.

Clanton TL. 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 2379–2388.

Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. 2008. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol.* 49:134–140.

Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. 1995. Melatonin protects neurons from singlet oxygen induced apoptosis. *J Pineal Res.* 18(4): 222-226.

Dakshinamurti S. 2005. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Pulmonol* 39: 492–503.

Del Pozo R, Hernandez I, Escribano-Subias P. 2017. The prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension: a clinical review. *Expert Rev Respir Med.*11 (6):491-503.

Dhaun N, Webb DJ. 2019. Endothelins in cardiovascular biology and therapeutics. *Nat Rev Cardiol.* doi: 10.1038/s41569-019-0176-3

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ.2012. Melatonin and Cardiovascular Disease: Myth. *Rev Esp Cardiol.* 65:215-8.

Dubocovich ML, Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptor in mammals. *Endocrine.* 27(2): 101-110.

Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, et al. 2017. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest.* 151(1):181-192.

Ebensperger G. 2011. Rol del sistema hemoxigenasa-monóxido de carbono en la regulación del tono y el remodelamiento vascular pulmonar del recién nacido de oveja crónicamente hipóxico”. PhD Tesis, Universidad de Chile.

Eivers SB, Kinsella BT. 2016. Regulated expression of the prostacyclin receptor (IP) gene by androgens within the vasculature: Combined role for androgens and serum cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* (10):1333-51.

Ernst A, Zibrak JD. 1998. Carbon monoxide poisoning. *N. Engl. J. Med.* 339, 1603–1608.

Euler UV, Liljestrand G. 1946. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand.* 12(4):301-320.

Fadel PJ. 2017. Nitric Oxide and Cardiovascular Regulation: Beyond the Endothelium. *Hypertension.* 69(5):778-779.

Friebe A, Shultz G, Koesling D. 1996. Sensitizing soluble guanylate cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 15: 6863-6868.

Filip-Ciubotaru F, Manciu C, Stoleriu G, Foia L. 2016. NADPH oxidase: structure and activation mechanisms. *Rev Med Chir Soc Med Nat.* 120(1):29-33.

Förstermann U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 459: 923–939.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. 2018. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules.* 27; 23(3).

Garcia-Navarro A, Gonzalez-Puga C, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Lopez-Cantareno M, et al. 2007. Cellular mechanisms involved in the melatonin on inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J Pineal Res.* 43(2): 195-205.

Geraci MW, Moore M, Gesell T. 2001. Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circ Res.* 88:555–62.

Gitto E, Marseglia L, Manti S. 2013. Protective role of melatonin in neonatal diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 980374, 2013.

Godson C, Reppert M. 1997. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocri.* 138(1): 538-553.

Goissen C, Ghyselen L, Tourneux P, Krim G, Storme L, Bou P. 2008. Persistent pulmonary hypertension of the newborn with transposition of the great arteries: successful treatment with bosentan. *Eur J Pediatr.* 167:437–40.

Gonzalez-Candia A, Veliz M, Carrasco-Pozo C, Castillo RL, Cárdenas JC, Ebensperger G, et al. 2019. Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Redox Biol.* 22:101128.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* 274(9):2163–2180.

Hernandez JM, Janssen LJ. 2015. Revisiting the usefulness of thromboxane-A2 modulation in the treatment of bronchoconstriction in asthma. *Can J Physiol Pharmacol.* ; 93(2):111-7.

Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebersperger G, et al. 2008. Carbon monoxide and pulmonary vasodilatation in neonatal llamas (*Lama glama*) at the Andean altiplano. *Cardiovasc Res.* 77(1):197-201.

Herrera EA, Riquelme RA, Ebersperger G, Reyes RV, Ulloa CE, Cabello G, et al. 2010. Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(6):1676-1684.

Herrera EA, Verkerk MM, Derks JB, Giussani DA. 2010. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. *PLoS One.* 17;5(2):e9250.

Heymann M. 1999. Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *Obstet Gynecol* 84:127–132.

Hood KY, Mair KM, Harvey AP, Montezano AC, Touyz RM, MacLean MR. 2017. Serotonin Signaling Through the 5-HT1B Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37(7):1361-1370.

Hooper SB, Wallace MJ. 2006. Role of the physicochemical environment in lung development. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 273–279.

Horváth B, Hortobágyi L, Lenzsér G, Schweer H, Hrabák A, Sándor P, et al. 2008. Carbon monoxide-prostaglandin E2 interaction in the hypothalamic circulation. *Neuroreport*. 19(16):1601-4.

Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. 2016. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol*. 77:143-75.

Ishikawa K, Matera K, Zhou H, Fuji H, Sato M, Yoshimura T, et al. 1998. Identification of histidine 45 as the axial heme iron ligand of heme oxygenase-2. *J Biol Chem* 273: 4317–4322.

Ivy D, Parker TA, Ziegler JW, Galan HL, Kinsella JP, Tudor RM. 1997. Prolonged endothelin A receptor blockade attenuates chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *J Clin Invest*. 99:1179–86.

Jain A, McNamara PJ. 2015. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Advances in diagnosis and treatment. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. *Semin Fetal Neonatal Med*. 20(4):262-71.

Jetten AM, Kurebayashi S, Ueda E. 2001. The ROR nuclear orphan receptor subfamily critical regulation of multiple biological processes. *Prog Nuclei Acid Res Mol Biol*. 69: 205-247.

Jeon EM, Choi HC, Lee KY, Chang KC, Kang YJ. 2009. Hemin inhibits hypertensive rat vascular smooth muscle cell proliferation through regulation of cyclin D and p21. *Arch Pharm Res*. 32(3):375-82.

- Jiang F, Roberts S, Datla S, Dusting G.** 2006. NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Hypertension.* 48:950–957.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangre P.** 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new. *Br J Pharmacol* 154: 1182–1195.
- Kanai F, Liu H, Field S J, Akbary H, Matsuo T, Brown G E, et al.** 2001. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* 3:675–678
- Kantari C, Walczak, H.** 2011. Caspase-8 and bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813, 558–563.
- Karaaslan C, Suzen S.** 2015. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr Top Med Chem.*15 (9):894-903.
- Kelly LK, Porta NF, Goodman DM, Carroll CL, Steinhorn RH.** 2002. Inhaled prostacyclin for term infants with persistent pulmonary hypertension refractory to inhaled nitric oxide. *J Pediatr.* 141:830–2.
- Kelly LE, Ohlsson A, Shah PS.** 2017. Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 4; 8: CD005494.
- Keyes L, Armaza J, Niermeyer S, Vargas E, Young D, Moore L.** 2003. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res.* 54: 20-25.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. 2005. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1; 558-567.

Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW. 2004. AMK. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18: 1080–1089.

Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, et al. 2013. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)*. 12; 10(1):7.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM. 1991. Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. *J Pineal Res*. 22(1): 23-39.

Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. 2017. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacol Rep*. 69(3):393-402.

Koçtürk S, Yüksel M, Aktan Ş, Oktay G, Resmi H, Şimşek H, et al. 2019. Melatonin attenuates the detrimental effects of UVA irradiation in human dermal fibroblasts by suppressing oxidative damage and MAPK/AP-1 signal pathway in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 10. doi: 10.1111/phpp.12456.

Koneru P, Leffler CW. 2004. Role of cgmp in carbon monoxide-induced cerebral vasodilation in piglets. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 286, H304–H309.

Koshkin V, Lotan O, Pick E. 1996. The cytosolic component p47phox is not a sine qua non participant in the activation of NADPH oxidase but is required for optimal superoxide production. *J. Biol. Chem.* 271:30326–30329.

Kvetnoy IM, Ingel IE, Kvetnasia TV, Malinovskaya NK, Rapoport SI, Raikchlim NT, et al. 2002. Gastrointestinal melatonin, identification and biological role. *Neuro endocrinol letter.* 23(2): 121-132.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR. 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 111:1201– 1209.

Lardone PJ, Guerrero JM, Fernandez-Santos JM, Rubio A, Martin-Lacavel, Carrillo-Vico A. 2011. Melatonin synthesized by T-lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J Pineal Res.* 51(4): 454-462.

Lad L, Schuller DJ, Shimizu H, Friedman J, Li H, Ortiz de Montellano PR, et al. 2003. Comparison of the heme-free and -bound crystal structures of human heme oxygenase-1 *J. Biol. Chem.* 278:7834-7843

Launay JM, Herve P, Callebert J. 2012. Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood.* 119: 1772–1780.

Lee SL, Simon AR, Wang WW, Fanburg BL. 2001. H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L646–652.

Lee TS, Chau LY.2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat. Med.* 8, 240–246.

León J, Casado J, Jiménez Ruiz SM, Zurita MS, González-Puga C, Rejón JD, et al, 2014. Salmerón J. Melatonin reduces endothelin-1 expression and secretion in colon cancer cells through the inactivation of FoxO-1 and NF- κ B. *J Pineal Res.* 56(4):415-26..

Llanos AJ, Ebersperger G, Herrera EA, Reyes RV, Cabello G, Díaz M, et al.2012. The heme oxygenase-carbon monoxide system in the regulation of cardiorespiratory function at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol.* 184: 186-191.

Lipton S, Choi J, Pan Z, Lei S, Chen V. 1993. Sucher NS, Loscalzo J, Singel DJ and Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitro compounds. *Nature* 364: 626-632.

Lönnqvist PA, Jonsson B. 1997. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med.* 336:597–604.

Luscher TF. 1992. Endothelin: systemic arterial and pulmonary effects of a new peptide with potent biologic properties. *Am Rev of Resp Dis.*146:S56–60.

MacLean MR. 2017. The serotonin hypothesis in pulmonary hypertension revisited: targets for novel therapies (Grover Conference Series). *Pulm Circ.* 8(2):2045894018759125.

Mamo LB, Suliman HB, Giles BL, Auten RL, Piantadosi CA, Nozik-Grayck E. 2004. Discordant extracellular superoxide dismutase expression and activity in neonatal hyperoxic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 170:313–318.

Maines MD, Gibbs PE. 2005. 30 some years of heme oxygenase: from a «molecular wrecking ball» to a «mesmerizing» trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:568-77.

Maines MD, Eke BC, Zhao X. 1996. Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain. *Brain Res* 722: 83–94.

Malhotra D. 2010. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 38, 5718–5734.

Maroti Z, Katona M, Orvos H, Nemeth I, Farkas I, Turi S. 2007. Heme oxygenase-1 expression in premature and mature neonates during the first week of life. *Eur J Pediatr.* 166:1033–1038.

McGrath JJ, Smith DL. 1984. Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 177: 132-136.

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725–732.

McCoubrey WK Jr, Maines MD. 1993. Domains of rat heme oxygenase-2: the amino terminus and histidine 151 are required for heme oxidation. *Arch Biochem Biophys* 302: 402–408.

Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC. 2002. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation*. 15; 105(2):244-50.

Michel T, Vanhoutte PM. 2010. Cellular signalling and NO production. *Pflugers Arch*. 459(6): 807-816.

Miller AF. 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 8(2):162-8.

Miller SL, Wallace E, Walker DW. 2012. Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine. *Neuroendocrinol*. 96:13-23.

Miralem T, Lerner-Marmarosh N, Gibbs PE, Tudor C, Hagen FK, Maines MD. 2012. The human biliverdin reductase-based peptide fragments and biliverdin regulate protein kinase C δ activity: the peptides are inhibitors or substrate for the protein kinase C. *J Biol Chem*.13; 24698-712.

Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM. 1999. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br J Pharmacol*.128: 730–734.

- Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, et al.** 2006. Carbon monoxide differentially inhibits tlr signaling pathways by regulating ros-induced trafficking of tlrs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 203, 2377–2389.
- Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group.** 1997. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *New Engl J Med.* 336:597–604.
- Ng KY, Leong MK, Liang H, Paxinos G.** 2017. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct.* 2017. 222(7):2921-2939.
- Nguyen XN, Abate A, Yang G, Weng YH, Dennery PA.** 2002. Nuclear translocation of heme oxygenase-1: a novel signaling pathway (Abstract). Proc Int Conf Heme Oxygenase (HO/CO) 2nd Catania, Sicily, Italy 2002, p. A52.
- Noguchi M, Yoshida T, Kikuchi G.** 1979. Specific requirement of NADPH-cytochrome c reductase for the microsomal heme oxygenase reaction yielding biliverdin IX. *FEBS Lett* 98: 281–284.
- Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J.** 2008. Hemooxigenasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. En Konigsberg M, editor, México: Manual Moderno. 247: 725–732.
- Oishi A, Cecon E, Jockers R.** 2018. Melatonin Receptor Signaling: Impact of Receptor Oligomerization on Receptor Function. *Int Rev Cell Mol Biol.* 338:59-77.

Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. 1997. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci.* 94:14483–14488.

Papamatheakis D, Chundu M, Blood A, Wilson S. 2013. Prenatal programming of pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia or ductal ligation in sheep. *Pulm Circ.* 3(4):757-780.

Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. 2009. Melatonin: a review. *J Exp Bot.* 60(1): 57-69.

Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavrier IM, et al. 2000. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:762–771.

Peñaloza D, Arias Stella J. 2007. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation.* 115(9):1132-46.

Piantadosi CA. 2002. Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 259–270.

Poulos TL, Li H. 2017. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design. *Nitric Oxide.* 28; 63:68-77.

Ragsdale SW, Yi L. 2011. Thiol/Disulfide redox switches in the regulation of heme binding to proteins. *Antioxid Redox Signal* 14: 1039–1047.

Reiter RL. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interaction. *Endocr Rev.* 12(2): 151-180.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.*34 (1): 79-80.

Reiter RJ, Tan DX.2002. Melatonin an antioxidant in edible plants. *Am NY Acad Sci.* 957: 341-344.

Reiter RJ, Tan DX. 2003. What constitutes a physiological concentration of melatonin. *J Pineal Res.* 34(1): 79-80.

Riquelme A. Disminución de la proliferación de músculo liso de la arteria pulmonar en ovejas recién nacidas en tierra altas por administración de hemina. Undergraduate Thesis, Ingeniería en Biotecnología, Universidad Arturo Prat, 2013.

Rodgers PA, Vremen HJ, Dennerly PA, Stevenson DK. 1994. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. *Semin Perinatol* 18: 2-10.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz M, Antolin I, Herrera F, Martin V. Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 36(1):1-9.

Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, et al. 2009. Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 180(4):353-64.

Roy CS, Sherrington CS. 1890. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *The Journal of physiology.* 11(1-2):85–158. 117.

Rudolph AM. 1979. Fetal and neonatal pulmonary circulation. *Ann Rev Physiol.* 41:383-395.

Salinas CE, Blanco CE, Villena M, Camm EJ, Tuckett JD. 2010. Developmental origin of cardiac and vascular disease in chick embryos incubated at high altitude. *JDOHaD.* 1(1): 60–66.

Sakamoto H, Omata Y, Palmer G, Noguchi M. 1999. Ferric hydroxyheme bound to heme oxygenase can be converted to verdoheme by dioxygen in the absence of added reducing equivalents. *J Biol Chem* 274 18196–18200.

Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ, Motterlini R. 2005. Carbon monoxide-releasing molecules (co-rms) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in raw264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 145, 800–810.

Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91:31S–38S

Simonneaux V. 2011. Naughty melatonin: How mothers tick off their fetus. *Endocrinology.* 152: 1734–1738.

Soditt V, Aring C, Groneck P. 1997. Improvement of oxygenation induced by aerosolized prostacyclin in a preterm infant with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Intensive Care Med.* 23:1275–8.

Song R, Mahidhara RS, Liu F, Ning W, Otterbein LE, Choi AM. 2002. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 603–610.

Song M, Choi S, Ryu P, Lee S. 2016. Voltage-Gated K⁺ Channel, Kv3.3 Is Involved in Hemin-Induced K562 Differentiation PLoS One. 2016.4: 291-299

Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, et al. 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* 30(4): 243-247.

Steinhiber D, Brugs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, et al. 1995. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 270(13): 7037-7040.

Steinhorn RH, Kinsella JP, Butrous G, Dilleen M, Oakes M, Wessel DL. 2009. Intravenous sildenafil in the treatment of neonates with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr.* 155 (6):841-847.

Steinhorn RH. 2010. Neonatal Pulmonary Hypertension. *Pediatr Crit Care Med. March.* 11(2 Suppl): S79–S84.

Stenmark KR, Orton EC, Reeves JT, Voelkel NF, Crouch EC, Parks WC. 1988. Vascular remodelling in neonatal pulmonary hypertension. Role of the smooth muscle cell. *Chest.* 93(3 Suppl):127S-133S.

Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. 2006. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res.* 29; 99(7):675-91.

Storme L, Aubry E, Rakza T, Houeijeh A, Debarge V, Tourneux P, et al. 2013. French Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn: Impact of the perinatal environment. *Arch Cardiovasc Dis.* 106(3):169-77.

Squecco R, Tani A, Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Francini F. 2015. Melatonin affects voltage-dependent calcium and potassium currents in MCF-7 cell line cultured either in growth or differentiation medium. *Eur J Pharmacol.* 758:40-52.

Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. 2012. Hypoxic pulmonary vasoconstriction *Physiol Rev.* 92(1), 367-520.

Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. 2012. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radi Biol Med.* 52: 1970–1986.

Taguchi K, Yamamoto M. 2017. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Front Oncol.* 4;7:85.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B. 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr.* 1:57-60.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, et al. 2000. Melatonin directly scavenger hydrogen peroxide a potentially new

metallic pathways of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med.* 29(11): 1177-1185.

Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, Wang HG, Liu J, Lee RM, et al. 2004. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic bax and bcl-2. *J. Biol. Chem.* 279, 30081–30091.

Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougerou C. 2017. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol.* 15(3):434-443.

Torres F, González-Candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Serón-Ferré M, et al. 2015. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res.* 58(3):362-73.

Tosini G, Owino S, Guillaume JL, Jockers R. 2014. Understanding melatonin receptor pharmacology latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *BioEssays.* 36(8):778–787.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, et al. 1999. Melatonin induces g-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol & Med.* 27; 838–847.

Van Patot MC, Ebensperger G, Gassmann M, Llanos AJ. 2012. The hypoxic placenta. *High Alt Med Biol.* 13(3):176-84.

Villanueva C. tesis. Efecto de melatonina pre y post natal sobre prostanoïdes vasoconstrictores en pulm3n de neonatos de oveja gestados en hipoxia cr3nica. Tesis de Magister. Universidad de Chile. 2016.

Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, et al. 2000. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics* 105:14–20.

Wang J, Rousseau D, Abu-Saud H, Steuhr DJ. 1994. Heme coordination of NO in NO synthase. *Proc Natl Acad Sei.* 25: 10512-10516.

Wang X, Wang Y, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. 2007. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J. Biol. Chem.* 282, 1718–1726.

Wedgwood S, Bekker JM, Black SM. 2001. Shear stress regulation of endothelial NOS in fetal pulmonary arterial endothelial cells involves PKC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281:L490–498.

Williams S, Wootton P, Mason S, Bould J, Iles D, Riccardi D, et al. .2004. Hemoxygenase-2 Is an Oxygen Sensor for a Calcium-Sensitive *Potassium Channel Science.* 306; 2093-2097.

Yoshida T, Kikuchi G. 1974. Sequence of the reaction of heme catabolism catalyzed by the Microsomal heme oxygenase system. *FEBS Lett* 48: 256–261.

Yuan JX, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ. 1998. Attenuated K channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 351:726–7.

Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. 2010. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*. 329, 182–186.

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. 1998. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta*. 1425(3):469-77.

Zhang JX, Qu XL, Chu P, Xie DJ, Zhu LL, Chao YL, et al. 2018. Low shear stress induces vascular eNOS uncoupling via autophagy-mediated eNOS phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1865(5):709-720.

Ziberna L, Martelanc M, Franko M, Passamonti S. 2016. Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Sci Rep*. 6:29-24.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/redox

Research Paper

Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep

Alejandro Gonzalez-Candia^a, Marcelino Veliz^a, Catalina Carrasco-Pozo^b, Rodrigo L. Castillo^{a,c}, J. Cesar Cárdenas^{d,e}, Germán Ebensperger^a, Roberto V. Reyes^a, Aníbal J. Llanos^{a,f}, Emilio A. Herrera^{a,f,*}

^a Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Salvador 486, Providencia 7500922, Santiago, Chile

^b Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Independencia 1027, Independencia, Santiago, Chile

^c Departamento de Medicina Interna Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^d Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^e Geroscience Center for Brain Health and Metabolism, Santiago, Chile

^f International Center for Andean Studies (INCAS), Universidad de Chile, Baquedano s/n, Putre, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Oxidative stress
Antioxidant system
Neonatal pulmonary circulation
Chronic hypoxia
Pulmonary pro-oxidant capacity
DOHaD

ABSTRACT

Chronic hypobaric hypoxia during fetal and neonatal life induces neonatal pulmonary hypertension. Hypoxia and oxidative stress are driving this condition, which implies an increase generation of reactive oxygen species (ROS) and/or decreased antioxidant capacity. Melatonin has antioxidant properties that decrease oxidative stress and improves pulmonary vascular function when administered postnatally. However, the effects of an antenatal treatment with melatonin in the neonatal pulmonary function and oxidative status are unknown. Therefore, we hypothesized that an antenatal therapy with melatonin improves the pulmonary arterial pressure and antioxidant status in high altitude pulmonary hypertensive neonates. Twelve ewes were bred at high altitude (3600 m); 6 of them were used as a control group (vehicle 1.4% ethanol) and 6 as a melatonin treated group (10 mg d⁻¹ melatonin in vehicle). Treatments were given once daily during the last third of gestation (100–150 days). Lambs were born and raised with their mothers until 12 days old, and neonatal pulmonary arterial pressure and resistance, plasma antioxidant capacity and the lung oxidative status were determined. Furthermore, we measured the pulmonary expression and activity for the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, and the oxidative stress markers 8-isoprostanes, 4HNE and nitrotyrosine. Finally, we assessed pulmonary pro-oxidant sources by the expression and function of NADPH oxidase, mitochondria and xanthine oxidase. Melatonin decreased the birth weight. However, melatonin enhanced the plasma antioxidant capacity and decreased the pulmonary antioxidant activity, associated with a diminished oxidative stress during postnatal life. Interestingly, melatonin also decreased ROS generation at the main pro-oxidant sources. Our findings suggest that antenatal administration of melatonin programs an enhanced antioxidant/pro-oxidant status, modulating ROS sources in the postnatal lung.

1. Introduction

More than 140 million people worldwide inhabit above 2500 m of altitude, a geographical condition that challenges pulmonary physiology under hypobaric hypoxia [1,2]. The chronic exposure to hypoxia during pregnancy at high altitude induces important cardiovascular responses, with an increased placental and pulmonary vasoconstriction in the pregnant mother and her fetus, resulting in a

intrauterine growth restricted neonate [3–5]. Furthermore, the postnatal pulmonary vasoconstriction derives in an enhanced cardiac afterload, with an elevated pulmonary arterial pressure and pathological pulmonary vascular and right ventricle remodelling [6,7]. These changes are key features for pulmonary hypertension of the neonate (PHN), a condition considered a failure in the fetal to neonatal pulmonary vascular transition associated with high mortality and morbidity in both low and high-altitude conditions [5,8,9]. One of the

* Corresponding author at: Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Salvador 486, Providencia 7500922, Santiago, Chile.

E-mail address: eherrera@med.uchile.cl (E.A. Herrera).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101128>

Received 30 September 2018; Received in revised form 27 January 2019; Accepted 28 January 2019

Available online 29 January 2019

2213-2317/ © 2019 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

causal mechanisms involved in the pathophysiology of PHN is oxidative stress, which implies an imbalance between an increased free radicals generation and/or decreased antioxidant capacity [10]. Hence, reactive oxygen species (ROS) excess is an important mediator of the hypoxic vascular constriction and endothelial dysfunction in the small pulmonary arteries [11–14]. The major sources involved in the oxidative stress determination at the vascular level are the mitochondria, NADPH oxidase, xanthine oxidase, and uncoupled endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [15].

Hypoxia is likely to increase the generation of ROS by several means. During hypoxia, the mitochondrial electron uncoupling at complexes I and III of the electron transport chain, enhances the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) generation. As superoxide production depends on electron donation from reduced components of the mitochondrial electron transport chain (flavin in Complex I, QH in Complex III) [12], anything that shifts these components towards a reduced state would enhance $O_2^{\cdot-}$ generation by accumulation of electrons upstream complex IV, thereby promoting superoxide formation with subsequent exit through an anion channel in the inner mitochondrial membrane [16].

The net rate of superoxide or hydrogen peroxide generation depends on the substrates present and the antioxidant systems active in the matrix and cytosol. In muscle mitochondria, there are four sites that determine $O_2^{\cdot-}$ generation, two in complex I and one each in complexes II and III. Specific suppressors of two sites have been identified, the outer ubiquinone-binding site in complex III (site IIIQo) and the site in complex I active during reverse electron transport (site IQ) [17]. These suppressors prevent superoxide/hydrogen peroxide production from a specific site without affecting oxidative phosphorylation, making them excellent tools to investigate the status of the sites in redox signaling. In addition, sites IIIQo and IQ have important roles in redox signaling (e.g. hypoxic signaling and ER-stress) and in causing oxidative damage in a variety of biological contexts [17,18].

Another enzymatic source of $O_2^{\cdot-}$ are the NADPH oxidases (Noxs) family, which includes Nox1, Nox3, Nox4 and Nox5. Importantly, Noxs might be the main sources for the ROS generation in the vascular smooth muscle cells [19], endothelial cells [20] and fibroblasts [21]. Accumulating evidence indicates that ROS derived from the Nox enzymes play an important role in the pulmonary vasoconstriction response to hypoxia, determining detrimental effects at vascular and cardiac level [15]. Another important source of $O_2^{\cdot-}$ is xanthine oxidase (XO) in the vascular cells. XO catalyzes the last two steps of purine metabolism by sequential hydroxylation of hypoxanthine to produce xanthine and uric acid, a process where oxygen is reduced to $O_2^{\cdot-}$ [22]. The enzyme can exist in two forms (oxidase and dehydrogenase), differing mainly in their substrate specificity. Dehydrogenase preferably uses NAD^+ as electron acceptor, while oxidase only reduces the molecular oxygen. The oxidase-dehydrogenase conversion occurs by proteolytic cleavage or by oxidation of thiol groups associated with an oxidative environment at the cellular level, becoming reversible by the electron-donation of molecular oxygen, thereby producing hydrogen peroxide (H_2O_2) and $O_2^{\cdot-}$ [23].

A dominant mechanism of endothelial dysfunction associated with oxidative stress is the nitric oxide bioavailability diminution by $O_2^{\cdot-}$ with the formation of peroxynitrite [24]. Reactive oxygen species may also uncouple eNOS due to oxidation of tetrahydrobiopterin (BH4) to dihydrobiopterin (BH2) [15]. Moreover, the oxidant tone favours sGC oxidation and increases the endogenous eNOS inhibitor, ADMA, particularly in hypoxic conditions [25].

All of the above markedly reduce the function of the nitrergic vasodilatory pathway in the utero-placental and pulmonary circulation [3,15]. Considering that hypoxia and oxidative stress has been proved as determinants in the development of intrauterine growth restriction (IUGR) and PHN, several antioxidant treatments have been proposed in perinatal medicine [26–29], where melatonin has important beneficial properties compared with other antioxidants [13, 30–33]. Its potent antioxidant properties are based on a direct scavenger action, the

upregulation of antioxidant enzymes, and the ability to downregulate pro-oxidant enzymes [34–36]. Interestingly, neither the fetus nor the neonate are capable of producing endogenous melatonin [37,38]. However, during gestation, the fetal blood melatonin comes from the mother as it freely crosses the placenta [38].

Here, we propose an antenatal treatment with melatonin aiming to attenuate the oxidative stress occurrence in chronically hypoxic neonatal lambs. Therefore, we hypothesized that a maternal treatment with oral melatonin during the last third of gestation to pregnant ewes, improves vascular pulmonary function, enhances the antioxidant capacity, decreases ROS generation and diminishes oxidative stress in the lung of high-altitude pulmonary hypertensive lambs.

2. Materials and methods

All animal care, procedures and experimentation were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Chile (protocol CBA#0398 FMUCH), and were conducted in accordance with the ARRIVE guidelines and carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the NIH Guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.1. Animals

Twelve ewes (*Ovis aries*) were bred, maintained and gave birth to 12 lambs under chronic hypobaric hypoxia (Putre, 3.600 m). The pregnant ewes received the same amount of alfalfa as percentage of their body weight. Six ewes conformed a control group (CN, 5 ml vehicle 1.4% ethanol) and 6 the melatonin treated group (MM, 10 mg d⁻¹ melatonin in 5 ml ethanol 1.4%). Treatments were given to the pregnant ewes, daily at dusk (18:00 h, oral), in the last third of gestation (100–150 d), until delivery. We obtained blood samples at the end of gestation in the morning (10:00) and at night (22:00) from the pregnant ewes.

Lambs were born without attendance and were raised with their mothers in a group pen. Daily neonatal weight and biparietal diameter (BPD) were recorded from birth until 12 days old.

The pregnant ewes and the lambs with their mothers were maintained in a roofed shed, equivalent to shade illuminated under clear blue sky, which can get to 20,000 lx at midday. At that time of the year (June–July), the sky is clear almost every day, and daylight photoperiod is about 11 h day/13 h night. The International Center for Andean Studies (INCAS) is a much insulated place away from city lights, therefore animals were only exposed to daylight. For the experimental period, we took care of not turning on the lights near the animal facility during the night, except for the moment of plasma sampling where we used mild intensity flashlights.

2.2. In vivo experiments

All lambs were instrumented at 2 days old for daily hemodynamic monitoring as described previously [13,39–41]. Briefly, lambs were anesthetized with a ketamine–xylazine association (10/0.04 mg/kg I.M.) and a Swan–Ganz catheter was placed in the pulmonary artery [13,39–41]. The animals recovered and the proximal end of the catheter was kept in a scarf attached to the animal's neck. At 3, 7 and 12 days of age, we assessed pulmonary arterial pressure (PAP), cardiac output (CO) and pulmonary vascular resistance (PVR) in both groups of lambs, recorded by a data acquisition system (Powerlab 8/30, ADInstruments). At 12 days postnatal, lambs underwent euthanasia with an overdose of sodium thiopentone (100 mg/kg, slow I.V. infusion), and pulmonary tissue samples from the medial lobe of the right lung were frozen and kept in liquid nitrogen [42].

2.3. *In vitro* experiments

2.3.1. Melatonin plasma levels

Maternal blood samples were taken at the end of gestation (147–149 days of gestation). Furthermore, neonatal blood samples were obtained at 3, 7 and 12 days old. Blood was immediately mixed with EDTA (1 mg/ml) and centrifuged at 5000 $\times g$ for 5 min to obtain plasma. Samples were obtained at 10:00 and 22:00 h to assess melatonin rhythmicity. Plasma levels of melatonin were determined by radio immunoassay as previously described [13,42], using melatonin antiserum (Guildhay Antiser Ltd., Guildford, Surrey, UK) and [O-methyl-³H]-labeled melatonin (85 Ci mmol/L; Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) as a tracer.

2.3.2. Total antioxidant capacity

Antioxidant status of the neonates was assessed by the ferric reducing ability of plasma (FRAP) at days 3, 7 and 12 of age. Due to the potential effects of plasma melatonin on the plasma reducing capacity, we determined FRAP at 10:00 and at 22:00 each day. Briefly, the FRAP solution was prepared by mixing 300 mM of acetate buffer (pH 3.6), 10 mM of 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution, and 20 mM of FeCl₃·6H₂O in a 10:1:1 ratio and by subsequent heating of the resultant mixture to 37 °C. The reaction mixture was composed of 750 μ l FRAP solution, 75 μ l H₂O and 25 μ l of the sample and then incubated at 25 °C in darkness for 30 min, and the absorbance was read at 593 nm. A standard curve ranging from 50 μ M to 1.5 mM of FeSO₄ was prepared for the quantitative determination of FeSO₄ as mM Fe²⁺ and FeSO₄ equivalents (eq) produced in the samples [43]. This method is based on the capacity of the plasma to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ by transferring an electron; this is interpreted as antioxidant capacity as, this is a mechanism used to stabilize a free radical. Fe²⁺ is chelated by TPTZ (TPTZ-Fe²⁺) and the complex is colorimetrically detected. Results are expressed as Fe²⁺ equivalent by interpolation and its disruption in the presence of chelating agents, measured in Fe²⁺ concentration, often used to measure the antioxidant capacity of fluids.

2.3.3. Protein expression

Protein expression of SOD2, CAT, GPx1, VDAC, p47-phox, Xanthine Oxidase and β -actin was determined in total lung lysates by immunoblot with specific antibodies (anti-Mn-SOD, Millipore, 06-984; anti-CAT, Abcam Laboratories, ab1877; anti-GPx1, Abcam Laboratories, ab22604; anti-VDAC, Millipore, AB10527; anti-p47-phox, Sigma Aldrich, SAB45028110; anti-Xanthine oxidase, Abcam, ab125133 and anti- β -actin, AC-15, Thermo Fisher Scientific, MA1-91399, respectively) as described previously [13]. The signals obtained on immunoblot determinations were scanned and quantified by densitometric analysis with a chemoluminescence detection device (Odyssey Imaging System, Li-Cor Biosciences).

2.3.4. Antioxidant enzyme activities

Activity of antioxidant enzymes in lung tissue homogenate was measured using the Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (K335-100, Biovision), OxiSelect Catalase Activity Assay Kit (STA-341, Cell Biolabs Inc.) and the Glutathione Peroxidase Assay Kit (703102, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), according to the manufacturers' guidelines. Sample protein concentration was used for normalization purposes [44].

2.3.5. Oxidative and nitrosative stress markers

The oxidative and nitrosative stress markers 4-HNE and NT, were also measured by Western blot with specific antibodies (anti-4-HNE, Abcam Laboratories ab46545; anti-NT, Millipore 05-233). Furthermore, 8-Isoprostanes concentration in lung homogenates was determined with a specific enzyme immunoassay (EIA) kit following manufacturer recommendations (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) [13] and uric acid was measured using the uric acid assay kit quantichron™ (DIUA-250)

(BioAssay Systems, Hayward, CA 94545, USA).

2.3.6. Redox status in the lung

The redox status in lung tissue was assessed by a fluorometric method in order to measure oxidized (GSSG) and reduced glutathione (GSH). Lung tissue was homogenized on ice using a Polytron homogenizer. The solution used for homogenization consisted of 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM triethanolamine, adjusted to pH 7.8. The total homogenate was centrifuged at 4 °C at 10,000 $\times g$ for 30 min to separate cytosolic fraction and the pellet was resuspended in 0.6 M sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 for the preparation of mitochondrial extracts. The o-phthalaldehyde (OPT) was used as a fluorescent reagent. This method assesses the reaction of GSH with OPT at pH 8 and of GSSG with OPT at pH 12; GSH can be complexed to N-ethylmaleimide to prevent interference of GSH with the measurement of GSSG [45]. The GSH/GSSG ratio was then calculated for total cytosolic fractions and for isolated mitochondria.

2.3.7. Pulmonary pro-oxidants sources in the lung

Mitochondrial extract was prepared from pulmonary tissue on ice using chilled buffers. Lung tissue from each sheep was homogenized individually in 25 volumes of a buffer composed of 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA and 0.5% (w/v) fatty acid-free BSA, pH 7.2, at 4 °C using a Teflon dounce homogenizer for 10 strokes. This homogenate was centrifuged at 1000 $\times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatant was collected and centrifuged at 12,000 $\times g$ for 10 min. Then the pellet was washed, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min and resuspended in a buffer containing 70 mM sucrose, 210 mM mannitol and 5 mM HEPES, pH 7.2, at 4 °C. This preparation was used immediately for assessing the mitochondrial superoxide production. The protein content was measured (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL USA). Superoxide anion production was assessed by measuring the oxidation of 10 μ M Dihydroethidium (DHE; 470Excitation/590Emission) for 10 min at 37 °C with the mitochondria preparation (20–50 μ g of protein). Mitochondria was assessed at State 1, a steady rate of respiration at basal condition under substrate starvation. This limits the O₂^{•-} production by the addition of exogenous substrate that potentiates the complex activities and promotes their artifactual individual contribution to the mitochondrial oxidative status. In order to evidence the specificity of DHE for O₂^{•-}, a control incubating the samples with SOD 100 U/ml for 10 min was also carried out (data not shown) [46]. In the presence of SOD, the DHE oxidation was only 10–15%, indicating that under this experimental condition the oxidation of DHE induced by H₂O₂ was marginal (raw data of the DHE oxidation is presented in [Supplementary Fig. 1S](#)). The H₂O₂-independent DHE oxidation was calculated as $URF_{DHE\ oxidation} - URF_{DHE\ oxidation\ in\ the\ presence\ of\ SOD}$.

NADPH oxidase activity was determined based on the rate of NADPH consumption monitored at 340 nm at 37 °C. The assay was performed on a solution containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 150 mM sucrose and tissue homogenate (2–10 μ g of protein). The enzymatic reaction was initiated by adding 0.1 mM NADPH. NADPH activity was calculated as μ moles of NADPH oxidized/mg protein/min. Only a slight oxidation of NADPH could be detected in the presence of 100 μ M apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase (2.35 μ moles NADPH oxidized/mg protein/min) [46].

Uric acid levels in the lung tissue were assessed using the uric acid assay kit from BioAssay Systems (Hayward, CA) as described by the manufacturer. Approximately 5 μ l of supernatant were reacted with 200 μ l of assay solution for 30 min at room temperature. Absorbance was read at 590 nm. A uric acid standard was prepared, and concentrations were calculated based on this standard [47].

2.4. Statistical analyses

All data were expressed as means \pm SEM. The Shapiro-Wilk test

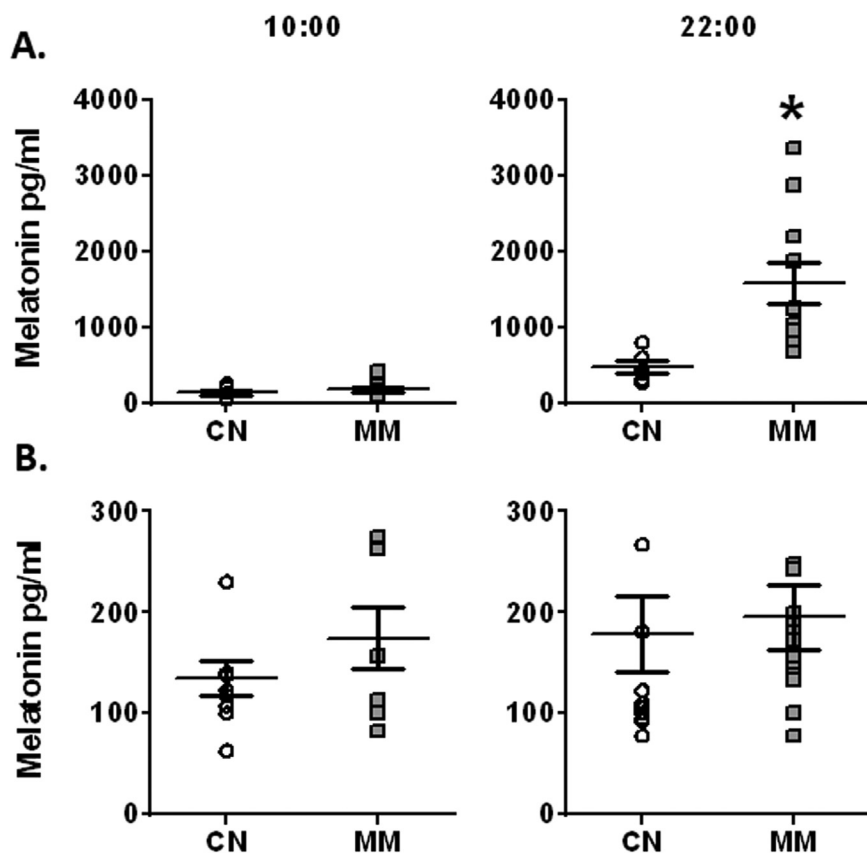


Fig. 1. Melatonin plasma levels in maternal and neonatal sheep. Melatonin treatment was given to the pregnant ewes in the last third of gestation. (A) Maternal samples were obtained at term gestation and (B) neonatal samples were obtained and averaged at 3, 7 and 12 days old. Values are means \pm SEM, determined in blood samples taken at 10:00 and 22:00. Groups are control (CN, open circles, $n = 6$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 6$). Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN.

was used to assess normality of data and results were compared statistically by a one-way ANOVA on ranks and Dunn's test, or a Mann-Whitney test, as appropriate. In addition, to assess the association of the antenatal treatment with the neonatal effects, all neonatal variables were correlated with nocturnal maternal levels of melatonin, and analyzed by a Pearson test. Significant differences were accepted when $P \leq 0.05$ (Prism 5.0; GraphPad Software).

3. Results

3.1. Maternal and neonatal melatonin in plasma

Melatonin plasma levels during the morning were similar between CN and MM groups in pregnant ewes. However, melatonin levels in ewes from the MM group were markedly increased at night-time, relative to CN group (Fig. 1A). Furthermore, melatonin levels of neonates did not change either between day and night, or along postnatal life. Therefore, we plotted the melatonin levels in one graph (Fig. 1B).

3.2. Neonatal birth weight and growth

Birth weight was significantly decreased in the melatonin treated group compared to CN (CN: 4.90 ± 0.44 vs MM: 3.45 ± 0.36 kg). Both groups of neonates increased their weight during postnatal life, while this difference was maintained (Fig. 2A).

Furthermore, birth biparietal diameter was decreased in MM relative to CN. However, the intrauterine treated animals caught-up the BPD growth at one week old, compared to CN animals (Fig. 2B).

3.3. Neonatal biometry and cardiopulmonary variables

Mean pulmonary arterial pressure (PAP), cardiac output (CO) and pulmonary artery vascular resistance (PVR) were similar between groups at 3, 7 and 12 days old. In addition, both groups of animals

tended to decreased these variables with time, with a significant fall in PAP and CO at 12 days old (Table 1).

3.4. Neonatal antioxidant capacity of plasma

FRAP (Fe^{2+}) levels showed a significant increase in the treated group (MM) relative to the control group, both during day and night-time, along the postnatal period (Fig. 3). The association between neonatal FRAP and nocturnal melatonin levels in the pregnant ewes did not show any significant correlation (data not shown).

3.5. Antioxidant enzymes function in the lung

The antioxidant enzymes were analyzed for their protein expression and activity in lung tissue. Protein expression of SOD2, CAT and GPX1 were similar between groups (Fig. 4A–C). However, melatonin treatment induced a marked decrease in the activity of SOD, CAT and GPX antioxidant enzymes in lung tissue relative to CN group (Fig. 4A–C). The relationship between neonatal antioxidant enzymes function and nocturnal melatonin levels in the pregnant ewes did not show any significant correlation (data not shown).

3.6. Pulmonary oxidative stress

MM neonates showed a significant reduction in the oxidative stress marker, 4HNE (Fig. 5A) and the nitrosative stress marker, NT (Fig. 5C) relative to the control group. However, 8-isoprostanes showed similar levels in both groups ($P = 0.1094$; Fig. 5B). The association between these oxidative stress markers and nocturnal melatonin levels in the pregnant ewes did not show any significant correlation (data not shown).

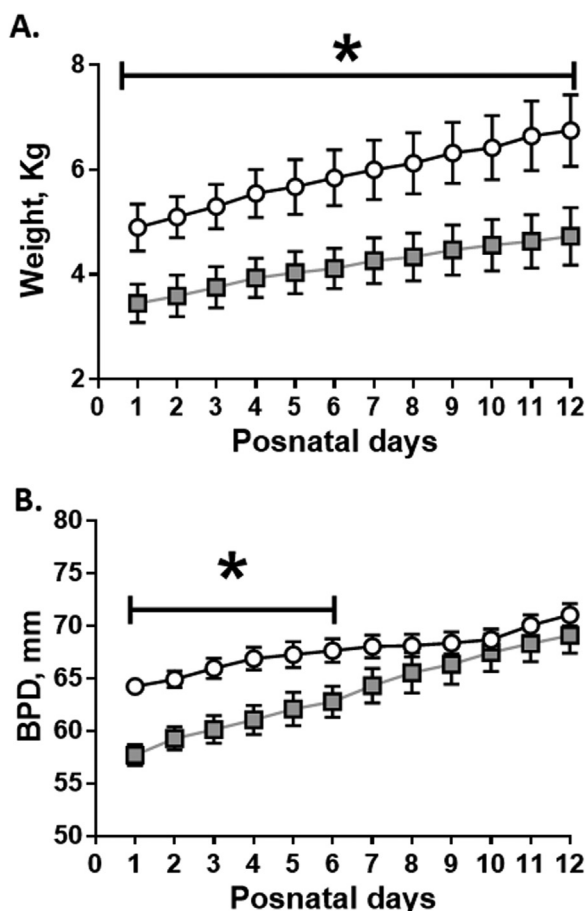


Fig. 2. Postnatal biometry in neonatal sheep. Daily measurements for weight (A) and biparietal diameter (DBP, B) during neonatal period. Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, $n = 6$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 6$) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN at equivalent days.

3.7. Pulmonary reduced/oxidized glutathione

Melatonin markedly increased GSH at cytoplasmic (CN, 11.23 ± 2.71 vs. MM, 21.33 ± 3.23 μM) and mitochondrial (CN 33.25 ± 8.83 vs. MM 43.50 ± 7.72 μM) compartments. In addition, melatonin increased GSSG at cytoplasmic level (CN 1.69 ± 0.08 vs. MM 2.24 ± 0.08 μM) without variations at mitochondrial level (CN 2.18 ± 0.75 vs. MM 2.36 ± 0.95 μM), relative to controls. Therefore, antenatal melatonin induced higher values of pulmonary GSH/GSSG ratio, both at cytoplasmic (Fig. 6A) and mitochondrial (Fig. 6B) compartments. However, the association between pulmonary reduced/oxidized glutathione and maternal nocturnal melatonin levels did not show any significant correlation (data not shown).

Table 1

Cardiopulmonary variables in neonatal sheep. Values are means \pm SEM, for pulmonary arterial pressure (PAP), cardiac output (CO) and pulmonary vascular resistance (PVR) recorded in 3, 7 and 12 days old lambs. Groups are control (CN, $n = 6$) and antenatal melatonin treated (MM, $n = 6$). Significant differences ($P \leq 0.05$): † vs. Day 3.

	Day 3		Day 7		Day 12	
	CN	MM	CN	MM	CN	MM
mPAP (mmHg)	36.1 ± 2.7	31.6 ± 2.3	31.2 ± 3.6	30.2 ± 2.0	$26.4 \pm 1.7^\dagger$	$24.3 \pm 2.6^\dagger$
CO ($\text{ml min}^{-1} \text{Kg}^{-1}$)	383 ± 39	407 ± 26	377 ± 32	362 ± 20	$314 \pm 19^\dagger$	$317 \pm 15^\dagger$
PVR ($\text{mmHg ml}^{-1} \text{min}^{-1} \text{Kg}^{-1}$)	0.083 ± 0.009	0.095 ± 0.009	0.084 ± 0.006	0.081 ± 0.008	0.082 ± 0.008	0.072 ± 0.007

3.8. Pulmonary pro-oxidants sources

The estimated mitochondrial population by the Voltage-dependent anion channels (VDAC) did not change between the analyzed groups. However, the mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production from lung tissue (URF) showed a marked decrease in MM relative to CN (Fig. 7A). In addition, the amount of total NADPH quantified as the expression of the p47-phox subunit was similar between groups (Fig. 7B); however the activity of NADPH oxidase was decreased in the MM group when compared to the CN group (Fig. 7B). Finally, the expression of xanthine oxidase did not change between analyzed groups (Fig. 7C) although uric acid, a marker of xanthine oxidase activity, decreased in the lung tissue of the animals treated with melatonin (Fig. 7C). Furthermore, the $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation from the three evaluated sources have a significant inverse correlation with melatonin (Fig. 7).

4. Discussion

The results of this study showed that maternal melatonin administration during the last third of gestation modulates the antioxidant capacity and pro-oxidant sources, leading to decreased oxidative stress in the newborn under chronic hypoxia. However, this treatment enhanced fetal growth restriction and did not have any clinical cardiopulmonary effect on postnatal life. Pregnancy at high altitude is associated with increased oxidative stress in the mother and the placenta, being of utmost importance for intrauterine fetal development, growth and programming [3,48–50]. Although we did not measure maternal and fetal arterial PO_2 in these animals, we have shown previously that pregnant ewes and the IUGR fetal sheep at 3600 m are markedly hypoxemic relative to lowland animals [4].

The administration regimen of melatonin at 10 mg/day to the pregnant ewe reinforces the plasma antioxidant capacity of newborns and decreased oxidative and nitrosative stress markers, measured even after 12 postnatal days without any treatment. This evidence supports that antenatal administration of melatonin regulates the postnatal REDOX status. In addition, these findings are consistent with the fact that antioxidants during development may program some postnatal cellular functions [49–51]. The main mechanisms by which melatonin may influence the REDOX status at prenatal and postnatal level, are the reinforcement of the antioxidant defense system [52] or the attenuation of ROS generation at the pro-oxidant sources. In our study, prenatal administration of melatonin did not change the expression of antioxidant enzymes SOD, GSH-Px and CAT, but it decreased the activity of these enzymes relative to the control group. Melatonin has a dual role of regulating nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2) gene induction by acetylation and recruiting the basal transcriptional machinery to the promoter region of Nrf2-related genes, inducing the expression of antioxidant enzymes [52–54]. This could happen while melatonin was administered, however the oxidative stress detection was carried out at 2 weeks old. Therefore, we speculate that upon reaching the steady state of Nrf2 induction, the proteasomic degradation was enhanced during the postnatal days due to a drop in the pro-oxidant state at the cellular level, thereby decreasing the induction and expression of antioxidant enzymes [55]. Interestingly, melatonin

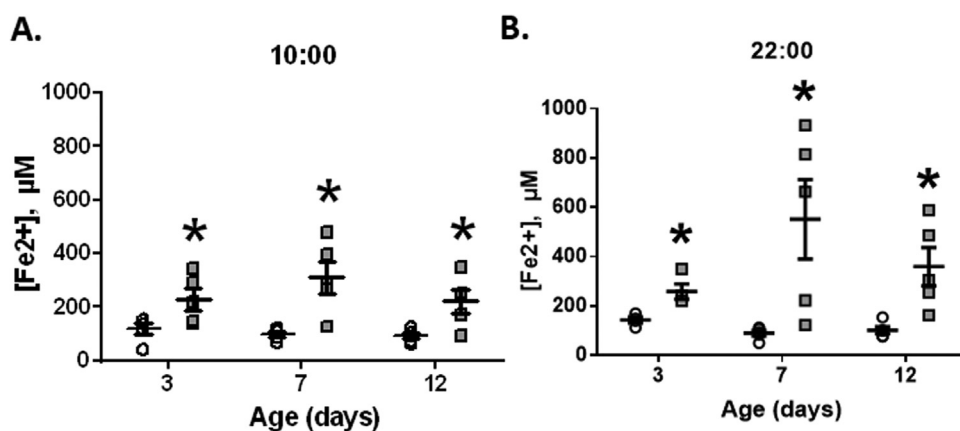


Fig. 3. Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) in neonatal sheep. Neonatal blood samples for FRAP determination were obtained at 10:00 (A) and 22:00 (B) during days 3, 7 and 12 days of age. Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, $n = 6$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 6$) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN at equivalent days.

induces the expression of antioxidant enzymes and decreased ROS production in previous studies with postnatal models [13,56]; however, these enzymes may become inactive due to the pro-oxidant transitory status of the cell [57,58].

On the other hand, the administration of melatonin achieved an increase GSH/GSSG ratio at cytosolic and mitochondrial levels. Such an effect may be explained by a melatonin-induced expression of the enzymes responsible for glutathione synthesis such as gamma glutamyl transpeptidase (γ -GGT) [59–61] or in the mechanisms of glutathione recycling by increasing the expression of the enzyme glutathione reductase (GSR) [61]. The latter mechanisms increase reduced glutathione bioavailability, which is responsible for the maintenance of the cellular redox state decreasing oxidative stress.

The most novel finding of this work is the long-lasting regulatory mechanisms exerted by melatonin on the main ROS sources at the pulmonary level involved in the pathophysiology of PHN. These sources are mitochondria, NADPH oxidases and xanthine oxidase [12], which were similar in expression but markedly reduced their activities with the melatonin treatment. Chronic hypoxia determines an incomplete reduction process on the oxygen final acceptor at the mitochondrial electron transport chain [62]. It seems that ubiquinone (UQ) could be responsible for ROS generation both at complex I and III level [63]. As well as being able to generate $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , mitochondria are themselves susceptible to be damaged by these compounds [64], therefore melatonin might be protecting the mitochondria. In fact, melatonin can be selectively taken up by mitochondria and acts as a powerful antioxidant, regulating the mitochondrial bioenergetic function, improving ATP synthesis and decreasing ROS formation [65,66]. To the best of our knowledge, there are no studies that describe melatonin effects on pulmonary mitochondrial function. However, it has been recently shown that neuronal mitochondria are able to produce melatonin, which upon binding to its melatonin type 1 (MT1) receptor on the mitochondrial membrane inhibits cytochrome c release, caspase activation, and apoptosis [67]. Nevertheless, it seems that this protective effect is tissue specific, as melatonin drives ATP synthesis [65] and increases angiogenesis in gastric endothelial cells [68]. The latter effects of melatonin on mitochondria are not only protective against oxidative stress, but also seems that melatonin is regulating mitochondrial function. In our study the prenatal administration of melatonin effectively modulates the production of ROS by decreasing the amount of superoxide anion generated by the mitochondria, but maintaining the mitochondrial population measured by VDAC expression. The potential underlying mechanism is that melatonin, is able to diffuse towards the mitochondria and reacts with free radicals generated by the decoupling of the respiratory chain in the mitochondrial crest (scavenger) [64]. Furthermore, melatonin may induce at the mitochondrial level the increase of GSH [59], therefore enhancing the mitochondrial antioxidant capacity. These effects were expressed in higher levels of GSH in both cytoplasmic and mitochondrial samples,

respect to control values. More interestingly, is the fact that this effect lasted in the lambs even after being born and raised without postnatal melatonin administration. Therefore, our study clearly supports melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant, particularly relevant in diseases related with oxidative stress and mitochondrial dysfunction [69]. Further studies will need to address the mechanisms determining this mitochondrial regulation.

NADPH oxidase (Nox) is present at plasma membranes in endothelial cells, smooth muscle and fibroblasts, where it releases $O_2^{\cdot-}$ that serves as a precursor for additional ROS, including hydrogen peroxide, hydroxyl radical, peroxynitrite and other oxidants [70]. This seems to be a main contribution to the pro-oxidant imbalance presented in pulmonary hypertension [17]. Recently, it has been shown that melatonin normalizes the increased Nox activity in the kidney of diabetic rats, accompanied by considerably lowered expression and diminished membrane distribution of the regulatory subunits, phosphop47(phox) and p67(phox) [71]. Furthermore, it has been postulated that melatonin could impair the assembly of NADPH oxidase, by inhibiting the phosphorylation of the p47phox subunit via a PI3K/Akt-dependent signaling pathway [72]. This blocks the translocation of p47phox and p67phox subunit to the membrane, down-regulates the binding of p47phox to gp91phox, and impairs the assembly of NADPH oxidase [70]. Therefore, melatonin has been shown to decrease NADPH activation and consequently ROS generation. These effects may result in cardioprotection against myocardial injuries induced by chronic hypoxia as shown in rats [73]. Similarly to our study, Yeung and colleagues found not only that Nox activity was decreased, but as well the levels of expression of the antioxidant enzymes SOD and CAT [73].

Furthermore, xanthine oxidase is the enzyme that catalyzes the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid with concomitant generation of anion superoxide [74]. Previous studies have shown that the expression of the xanthine oxidase enzyme is regulated by hypoxia, increasing its expression in the lung [75]. Melatonin treated newborns decreased uric acid concentration, suggests a reversal of this effect. As we did not have any difference in XO protein expression, we proposed that melatonin decreased xanthine oxidase activity, which was confirmed in this study. As far as the authors are aware, only one study has seen this effect on rat testis [76], however no mechanism has been proposed by which melatonin can decrease XO activity, even in the long-term. Furthermore, a handful of studies have searched for the XO role during development in cardiovascular function [77,78], with impact in peripheral and central vascular function. However, further studies need to be done to precisely define the mechanisms determining the long lasting effects of melatonin on decreasing XO activity.

All of the neonatal findings are associated with an antenatal treatment, up to 2 weeks after birth. Therefore, antenatal melatonin must be programming the different determinants of the pulmonary redox status. Several studies have based the developmental programming on

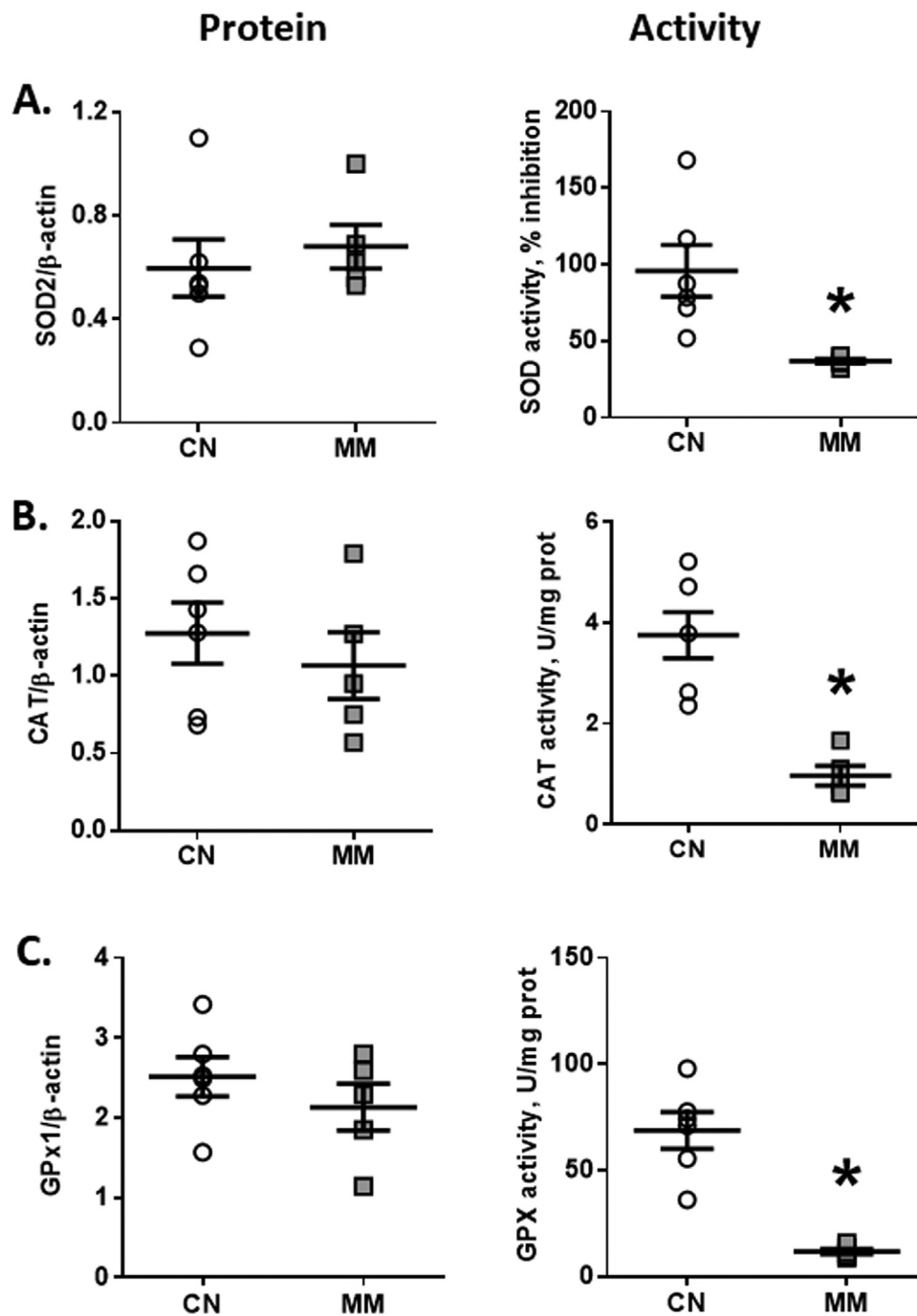


Fig. 4. Enzymatic antioxidant function in neonatal lung. Neonatal lung samples were obtained at 12 days old for protein expression and activity of superoxide dismutase (SOD, A), catalase (CAT, B) and glutathione peroxidase (GPx, C). Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, n = 5) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, n = 5) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN.

epigenetic changes, referring to DNA methylation, histone modification and RNA interference, among others as regulator of gene silencing or expression [79]. For instance, melatonin might inhibit DNA methyltransferases (DNMT) and histone deacetylase (HDAC) [80,81].

Until now, few studies have proposed the mechanisms under which melatonin may be programming future gene expression and vascular function under development. However, there are reports that maternal melatonin during pregnancy effectively protect the fetal development and birth. For example, in a continuous melatonin deficiency in a pregnant rat model, offspring developed intrauterine growth retardation, which was prevented by maternal melatonin treatment [82]. Similarly, maternal melatonin regulates fetal organogenesis and

functions, such as adrenal gland, that are critical for the successful adaptation of the neonate to extra-uterine environment [83]. Furthermore, some studies show that both light/dark environmental cues [84] or melatonin treatment [85] turns on/off microRNA programs that control the REDOX state of cells after many complete proliferative cycles, favoring a longlasting cardioprotective state. In addition, melatonin treatment affects oocytes DNA methylation pattern, reversing the effects of oocyte aging [86]. Thus, although we did not find differential protein expression for the antioxidant enzymes, a recent study in lambs showed that melatonin decreased total DNA methylation of SOD1, GPx4 and CAT, favoring the antioxidant capacity [87]. The melatonin-induced epigenetic regulation must be acting in the pulmonary

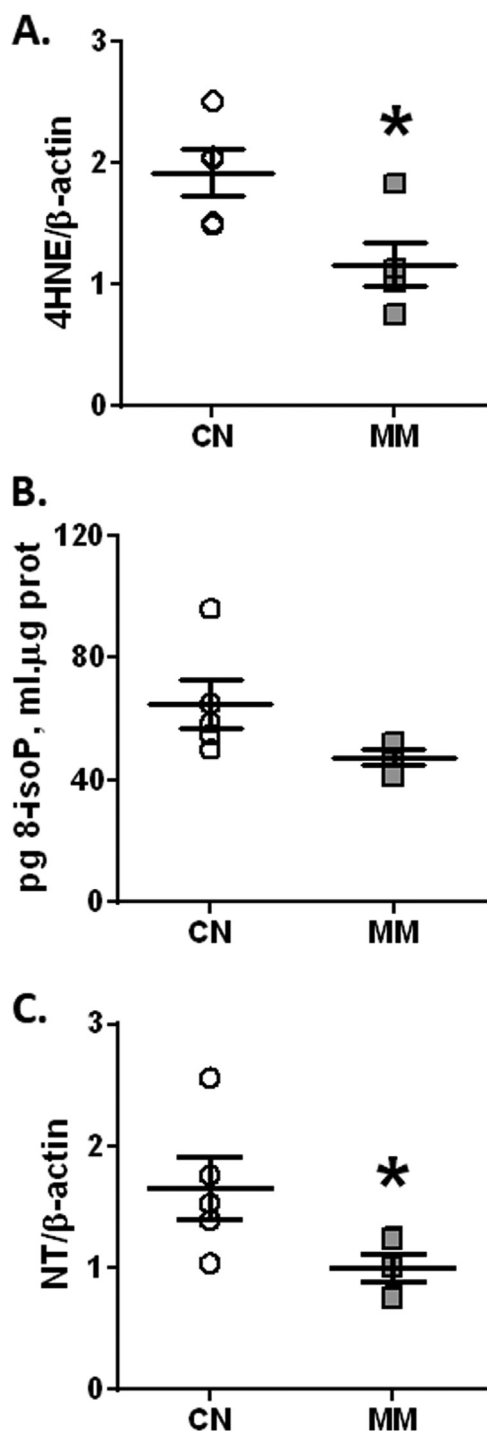


Fig. 5. Oxidative stress markers in neonatal lung. Neonatal lung samples were obtained at 12 days old for 4-HNE 70KDa (A), 8-isoprostanes (B) and NT 85KDa (C) determination. Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, $n = 5$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 5$) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN.

vasculature of the treated lambs, promoting a balanced REDOX state.

The DOHaD concept offers the potential reprogramming strategy to shift the treatment from adulthood to early life, long before clinical disease appears. In fact, the developmental window of our melatonin intervention was effective for reprogramming the pulmonary redox status towards a diminished pro-oxidant activity.

This study supports our recently published data, where we showed that antenatal melatonin induce a further decrease in birth weight in

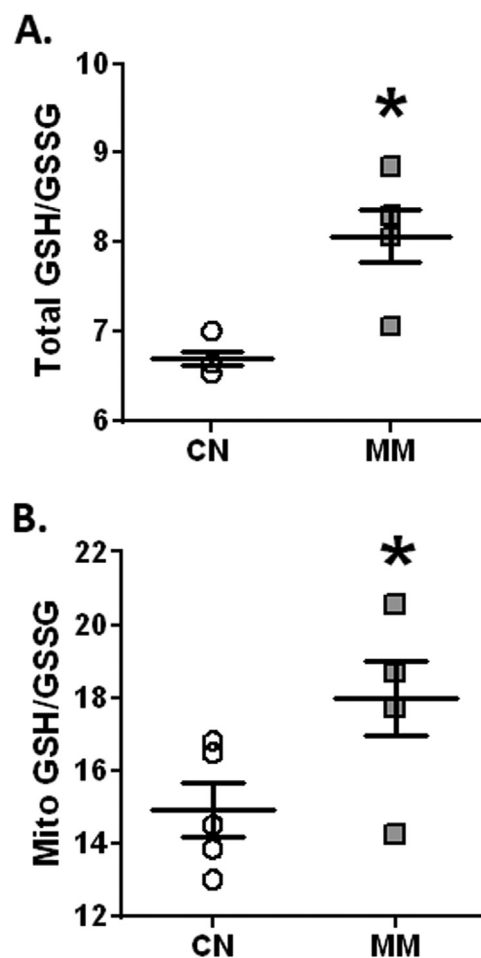


Fig. 6. Reduced/oxidized glutathione in neonatal lung. Neonatal lung samples were obtained at 12 days old for the total (A) and mitochondrial (B) levels of the GSH/GSSG ratio determinations. Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, $n = 6$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 6$) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN.

these high-altitude sheep [42]. A novel study in knock-out mice may partially explain this issue, where a melatonin antenatal treatment was effective in increasing birth weight in IUGR wild-type mice, whereas it did not improve birth weight in nitric oxide synthase knockout (eNOS $^{-/-}$) and the placental specific Igf2 knockout (PO + $^{-/-}$) mice. We speculate then that the high-altitude sheep may have an NO or IGF2 impaired expression that prevented the melatonin effects on birth weight. Both of these knockout mice show placental complications, increased oxidative stress and IUGR [88].

In this study, we give further evidence that melatonin might be considered for antenatal treatment in complicated pregnancies as it decreases oxidative stress, programming the future neonatal pulmonary oxidative tone. Consistent with our work, the long-term effects of antenatal melatonin has been recently described as neuroprotective, diminishing brain damage and neurodevelopmental impairments in a preterm and fetal brain injury models, presumably due to a decreased inflammation burst [89,90].

Chronic non-communicable diseases (NCDs) can originate from perinatal sub-optimal conditions, a concept known as developmental origins of health and disease (DOHaD). Several intrauterine conditions have been shown to program cellular and organ functions that augment the risk of developing NCDs, such as undernutrition, overnutrition, hypoxia and oxidative stress among others. This concept offers the “reprogramming” strategy to shift the treatment from adulthood to early life, before clinical disease is evident [48]. Antenatal melatonin

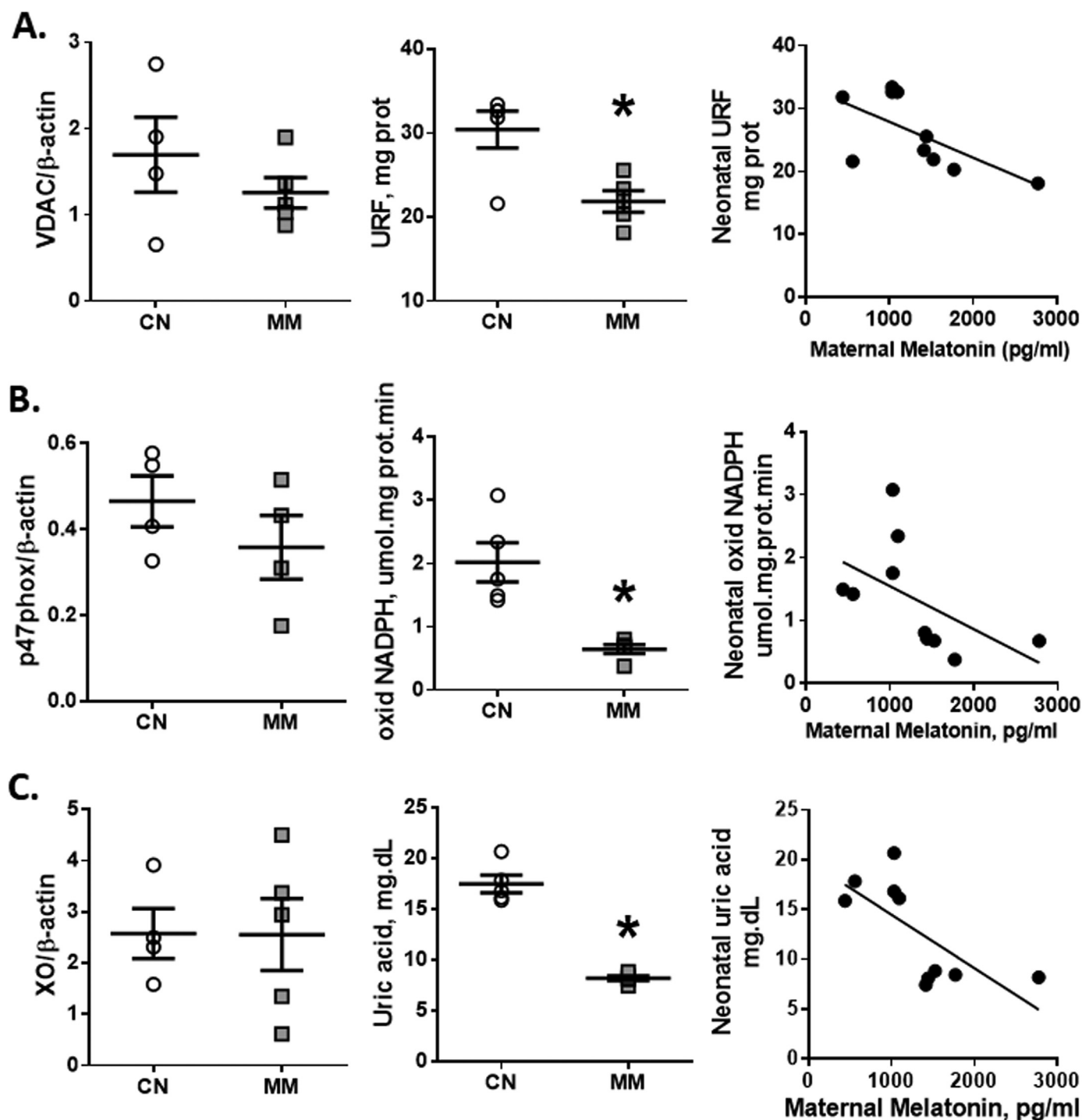


Fig. 7. Cellular pro-oxidant sources in neonatal lung. Neonatal lung samples were obtained at 12 days old for the source expression (left column), ROS generation (central column) and the correlation between maternal melatonin and neonatal ROS generation (right column) from the mitochondria (A), NADPH oxidase (B) and xanthine oxidase (C). Values are means \pm SEM. Groups are control (CN, open circles, $n = 5$) and antenatal melatonin treated (MM, grey squares, $n = 5$) lambs. Significant differences ($P \leq 0.05$): * vs. CN.

treatment has been proposed as one of the strategies to revert intrauterine complications but as well, to reprogram the developing individual [91,92]. Melatonin may act on developmental programming by reinforcement of the antioxidant capacity, NO function modulation and reversal of pathologic epigenetic modifications, offering possibilities of correcting gestational malprogramming. However, further research is needed to uncover the involved mechanisms, possible affected signaling pathways and clinical translation.

5. Conclusion

The night-time administration of melatonin during the last third of gestation in high-altitude ewes decreased the main pro-oxidant ROS sources at the cellular level, reducing oxidative stress and reinforcing the antioxidant status at the pulmonary level in newborns with PHN. Although some potential adverse effects of melatonin has been described in this model, we consider that the capacity of antenatal melatonin to modulate postnatal oxidative balance and further pulmonary

function merits more research in this area. Our findings add a novel long-lasting ability of melatonin, supporting its use as a therapeutic agent for neonatal diseases that coexist with chronic hypoxia and oxidative stress, as proposed by some researchers.

Acknowledgements

We are very grateful to Mr. Carlos Brito and Mr. Gabino Llusco for their excellent technical assistance. This work was funded by the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT) grants no 1110595, 1140647, 11130232, 1151119, and CONICYT/FONDAP #15150012.

Declarations of interest

none.

Conflict of interests

None to declare.

Author contributions

AG-C, MV, RLC, CC-P, JCC, GE, RVR, AJLL and EAH conceived and designed the experiments. AG-C, MV, CC-P, RLC and EAH collected, analyzed and interpreted the experimental data. AGC and EAH drafted the article, and all authors revised it critically and approved the final version.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.redox.2019.101128](https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101128).

References

- [1] L.G. Moore, M. Shriver, L. Bemis, B. Hickler, M. Wilson, T. Brutsaert, et al., Maternal adaptation to high-altitude pregnancy: an experiment of nature review, *Placenta* 25 (Suppl. A) (2004) S60–S71.
- [2] E.A. Herrera, J.G. Farías, G. Ebensperger, R.V. Reyes, A.J. Llanos, R.L. Castillo, Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: a tale of two exposures, *Pharmacol. Res.* 101 (2015) 94–101.
- [3] E.A. Herrera, B. Krause, G. Ebensperger, R.V. Reyes, P. Casanello, M. Parra-Cordero, et al., The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus, *Front. Pharmacol.* 24 (5) (2014) 149.
- [4] E.A. Herrera, R.T. Rojas, B.J. Krause, G. Ebensperger, R.V. Reyes, D.A. Giussani, et al., Cardiovascular function in term fetal sheep conceived, gestated and studied in the hypobaric hypoxia of the Andean Altiplano, *J. Physiol.* 594 (5) (2016) 1231–1245.
- [5] L.E. Keyes, J.F. Armaza, S. Niermeyer, E. Vargas, D.A. Young, L.G. Moore, Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia, *Pediatr. Res.* 54 (2003) 20–25.
- [6] B. Basnyat, D.R. Murdoch, High-altitude illness, *Lancet* 361 (2003) 1967–1974.
- [7] D. Peñaloza, J. Arias Stella, The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness, *Circulation* 115 (9) (2007) 1132–1146.
- [8] S. Lakshminrusimha, O.D. Saugstad, The fetal circulation, pathophysiology of hypoxic respiratory failure and pulmonary hypertension in neonates, and the role of oxygen therapy, *J. Perinatol.* 36 (Suppl. 2) (2016) S3–S11.
- [9] M.C. Walsh-Sukys, J.E. Tyson, L.L. Wright, C.R. Bauer, S.B. Korones, D.K. Stevenson, et al., Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes, *Pediatrics* 105 (2000) 14–20.
- [10] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* 82 (2) (1997) 291–295.
- [11] Y. Gao, J.U. Raj, Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn, *Physiol. Rev.* 90 (4) (2010) 1291–1335.
- [12] J.T. Sylvester, L.A. Shimoda, P.I. Aaronson, J.P. Ward, Hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Physiol. Rev.* 92 (1) (2012) 367–520.
- [13] F. Torres, A. González-Candia, C. Montt, G. Ebensperger, M. Chubretovic, M. Serón-Ferré, et al., Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep, *J. Pineal Res.* 58 (3) (2015) 362–373.
- [14] N. Sommer, L. Strielkov, O. Pak, N. Weissman, Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Eur. Respir. J.* 47 (2015) 288–303.
- [15] D.M. Tabima, S. Frizzell, M.T. Gladwin, Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (9) (2012) 1970–1986.
- [16] H.P. Misra, I. Fridovich, The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 188–192.
- [17] M.D. Brand, Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 100 (2016) 14–31.
- [18] D. Munro, J.R. Treberg, A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species, *J. Exp. Biol.* 220 (Pt 7) (2017) 1170–1180.
- [19] A. Konior, A. Schramm, M. Czesnikiewicz-Guzik, T.J. Guzik, NADPH oxidases in vascular pathology, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (17) (2014) 2794–2814.
- [20] A. Chatterjee, S.M. Black, J.D. Catravas, Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation, *Vasc. Pharmacol.* 49 (2008) 134–140.
- [21] P.J. Pagano, J.K. Clark, M.E. Cifuentes-Pagano, S.M. Clark, G.M. Callis, M.T. Quinn, Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II, *PNAS* 94 (1997) 14483–14488.
- [22] W. Doehner, U. Landmesser, Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options, *Semin. Nephrol.* 31 (5) (2011) 433–440.
- [23] T. Nishino, K. Okamoto, B.T. Eger, E.F. Pai, Mammalian xanthine oxidoreductase mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, *FEBS J.* 275 (2008) 3278–3289.
- [24] H. Cai, D.G. Harrison, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ. Res.* 87 (2000) 840–844.
- [25] N. Lüneburg, P. Siques, J. Brito, K. Arriaza, E. Pena, H. Klose, et al., Long-term chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats causes an imbalance in the asymmetric dimethylarginine/nitric oxide pathway and ROS activity: a possible synergistic mechanism for altitude pulmonary hypertension? *Pulm. Med.* 2016 (2016) 6578578.
- [26] J.G. Farías, E.A. Herrera, C. Carrasco-Pozo, R. Sotomayor-Zárate, G. Cruz, P. Morales, et al., Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress, *Pharmacol. Ther.* 158 (2016) 1–23.
- [27] S.L. Miller, E.M. Wallace, D.W. Walker, Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine, *Neuroendocrinology* 96 (2012) 13–23.
- [28] S.R. Hobson, R. Lim, E.M. Wallace, Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by preeclampsia, *Methods Mol. Biol.* 1710 (2018) 335–345.
- [29] S.R. Yiallourou, E.M. Wallace, S.L. Miller, R.S. Horne, Effects of intrauterine growth restriction on sleep and the cardiovascular system: the use of melatonin as a potential therapy? *Sleep Med. Rev.* 26 (2016) 64–73.
- [30] S. Aversa, S. Pellegrino, I. Barberi, R.J. Reiter, E. Gitto, Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 25 (2012) 207–221.
- [31] G. Buonocore, F. Groenendaal, Anti-oxidant strategies, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12 (4) (2007) 287–295.
- [32] E. Gitto, L. Marsiglia, S. Manti, G. D'Angelo, I. Barberi, C. Salpietro, et al., Protective role of melatonin in neonatal diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2013) 980374.
- [33] D.X. Tan, R. Hardeland, L.C. Manchester, B. Poeggeler, S. Lopez-Burillo, J.C. Mayo, et al., Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical, *J. Pineal Res.* 34 (4) (2003) 249–259.
- [34] A. Galano, D.X. Tan, R.J. Reiter, On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 245–257.
- [35] R.J. Reiter, D.X. Tan, J.C. Mayo, R.M. Sainz, J. Leon, Z. Czarnocki, Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans, *Acta Biochim. Pol.* 50 (2003) 1129–1146.
- [36] C. Rodríguez, J.C. Mayo, R.M. Sainz, I. Antolín, F. Herrera, V. Martín, et al., Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *J. Pineal Res.* 36 (2004) 1–9.
- [37] L.E. Claypool, R.I. Wood, S.M. Yellon, D.L. Foster, The ontogeny of melatonin secretion in the lamb, *Endocrinology* 124 (1989) 2135–2143.
- [38] M. Serón-Ferré, C. Torres-Farfán, M.L. Forcelledo, G.J. Valenzuela, The development of circadian rhythms in the fetus and neonate, *Semin. Perinatol.* 25 (2001) 363–370.
- [39] E.A. Herrera, V.M. Pulgar, R.A. Riquelme, E.M. Sanhueza, V.R. Reyes, G. Ebensperger, et al., High altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 (6) (2007) R2234–R2240.
- [40] E.A. Herrera, B.J. Krause, G. Ebensperger, R.A. Riquelme, V.R. Reyes, M. Capetillo, et al., Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep, *Pediatr. Res.* 63 (2) (2008) 169–175.
- [41] C.A. Astorga, A. González-Candia, A.A. Candia, E.G. Figueroa, D. Cañas, G. Ebensperger, et al., Melatonin decreases pulmonary vascular remodelling and oxygen sensitivity in pulmonary hypertensive newborn lambs, *Front. Physiol.* 9 (2018) 185.
- [42] A. González-Candia, M. Veliz, C. Araya, S. Quezada, G. Ebensperger, M. Serón-Ferré, et al., Potential adverse effects of antenatal melatonin as a treatment for intrauterine growth restriction: findings in pregnant sheep, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 215 (2) (2016) 245 (e1-7).
- [43] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76.
- [44] V. Peddireddy, B. Siva Prasad, S.D. Gundimedda, P.R. Penagaluru, H.P. Mundluru, Assessment of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer, *Biomarkers* 17 (2012) 261–268.
- [45] P.J. Hissin, R.A. Hilf, Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226.

- [46] E.A. Herrera, J.G. Farías, A. González-Candia, S.E. Short, C. Carrasco-Pozo, R.L. Castillo, $\Omega 3$ supplementation and intermittent hypobaric hypoxia induce cardioprotection enhancing antioxidant mechanisms in adult rats, *Mar. Drugs* 13 (2) (2015) 838–860.
- [47] M.A. Whidden, J.M. McClung, D.J. Falk, M.B. Hudson, A.J. Smuder, W.B. Nelson, et al., Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction, *J. Appl. Physiol.* 106 (2009) 385–394.
- [48] M.A. Hanson, P.D. Gluckman, Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol. Rev.* 94 (4) (2014) 1027–1076.
- [49] L.P. Thompson, Y. Al-Hasan, Impact of oxidative stress in fetal programming, *J. Pregnancy* (2012) 582–748.
- [50] D.A. Giussani, E.J. Camm, Y. Niu, H.G. Richter, C.E. Blanco, R. Gottschalk, et al., Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress, *PLoS One* 7 (2) (2012) e31017.
- [51] Y.C. Chen, J.M. Sheen, M.M. Tiao, Y.L. Tain, L.T. Huang, Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 5380–5401.
- [52] Z. Sun, Y.E. Chin, D.D. Zhang, Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 2658–2672.
- [53] Y. Kawai, L. Garduño, M. Theodore, J. Yang, L.J. Arinze, Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 7629–7640.
- [54] A. Korkmaz, S. Rosales-Corral, R.J. Reiter, Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena, *Gene* 503 (2012) 1–11.
- [55] Y. Huang, W. Li, Z.Y. Su, A.N. Kong, The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response, *J. Nutr. Biochem.* 26 (12) (2015) 1401–1413.
- [56] A. Leibowitz, A. Volkov, K. Voloshin, C. Shemesh, I. Barshack, E. Grossman, Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 48–54.
- [57] C. Carrasco-Pozo, M. Gotteland, R.L. Castillo, C. Chen, 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol, *Exp. Cell Res.* 334 (2) (2015) 270–282.
- [58] A. Lochner, E. Marais, B. Huisamen, Melatonin and cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: what's new? *J. Pineal Res.* 65 (1) (2018) e12490.
- [59] Y. Urata, S. Honma, S. Goto, S. Todoroki, T. Iida, S. Cho, et al., Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (7–8) (1999) 838–847.
- [60] A.Y. Shih, D.A. Johnson, G. Wong, A.D. Kraft, L. Jiang, H. Erb, et al., Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potentially protects neurons from oxidative stress, *J. Neurosci.* 23 (8) (2003) 3394–3406.
- [61] J.H. Limón-Pacheco, M.E. Gonsebatt, The glutathione system and its regulation by neurohormone melatonin in the central nervous system, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 1 (4) (2010) 287–297 (10).
- [62] D.B. Zorov, M. Juhaszova, S. Sollott, Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 909–950.
- [63] G. Barja, Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity, *J. Bioenerg. Biomembr.* 31 (1999) 347–366.
- [64] D. Acuña-Castroviejo, M. Martín, M. Macías, G. Escames, J. León, H. Khaldy, et al., Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics, *J. Pineal Res.* 30 (2001) 65–74.
- [65] K. Kleszczyński, D. Zillikens, T.W. Fischer, Melatonin enhances mitochondrial ATP synthesis, reduces reactive oxygen species formation, and mediates translocation of the nuclear erythroid 2-related factor 2 resulting in activation of phase-2 antioxidant enzymes (γ -GCS, HO-1, NQO1) in ultraviolet radiation-treated normal human epidermal keratinocytes (NHEK), *J. Pineal Res.* 61 (2) (2016) 187–197.
- [66] R. Sharafati-Chaleshtori, H. Shirzad, M. Rafeian-Kopaei, A. Soltani, Melatonin and human mitochondrial diseases, *J. Res. Med. Sci.* 22 (2017) 2.
- [67] Y. Suofu, W. Li, F.G. Jean-Alphonse, J. Jia, N.K. Khattar, J. Li, et al., Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release, *PNAS USA* 114 (38) (2017) E7997–E8006.
- [68] A. Ahluwalia, I.M. Brzozowska, N. Hoa, M.K. Jones, A.S. Tarnawski, Melatonin signaling in mitochondria extends beyond neurons and neuroprotection: implications for angiogenesis and cardio/gastroprotection, *PNAS USA* 115 (9) (2018) E1942–E1943.
- [69] M.R. Ramis, S. Esteban, A. Miralles, D.X. Tan, R.J. Reiter, Protective Effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: a review, *Curr. Med. Chem.* 22 (22) (2015) 2690–2711.
- [70] J. Zhou, S. Zhang, X. Zhao, Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid- β 1–42, *J. Pineal Res.* 45 (2008) 157–165.
- [71] K. Winiarska, J.M. Dzik, M. Labudda, D. Focht, B. Sierakowski, A. Owczarek, et al., Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase, *J. Pineal Res.* 60 (1) (2016) 109–117.
- [72] O. Perisic, M.I. Wilson, D. Karathanassis, J. Bravo, M.E. Pacold, C.D. Ellison, et al., The role of phosphoinositides and phosphorylation in regulation of NADPH oxidase, *Adv. Enzym. Regul.* 44 (2004) 279–298.
- [73] H.M. Yeung, M.W. Hung, C.F. Lau, M.L. Fung, Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats, *J. Pineal Res.* 58 (1) (2015) 12–25.
- [74] R. Hille, T. Nishino, Xanthine oxidase and Xanthine dehydrogenase, *FASEB J.* 9 (1995) 995–1003.
- [75] P.M. Hassoun, F.S. Yu, C.G. Cote, J.J. Zulueta, R. Sawhney, K.A. Skinner, et al., Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1 and hypoxia: role in acute lung injury, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 158 (1998) 299–305.
- [76] D. Sokolovic, B. Djordjevic, G. Kocic, T.J. Stoimenov, Z. Stanojkovic, D.M. Sokolovic, et al., The effects of melatonin on oxidative stress parameters and DNA fragmentation in testicular tissue of rats exposed to microwave radiation, *Adv. Clin. Exp. Med.* 24 (3) (2015) 429–436.
- [77] E.A. Herrera, A.D. Kane, J.A. Hansell, A.S. Thakor, B.J. Allison, Y. Niu, et al., A role for xanthine oxidase in the control of fetal cardiovascular function in late gestation sheep, *J. Physiol.* 590 (8) (2012) 1825–1837.
- [78] A.D. Kane, J.A. Hansell, E.A. Herrera, B.J. Allison, Y. Niu, K.L. Brain, et al., Xanthine oxidase and the fetal cardiovascular defence to hypoxia in late gestation ovine pregnancy, *J. Physiol.* 592 (3) (2014) 475–489.
- [79] P. Casanella, D. Schneider, E.A. Herrera, R. Uauy, B.J. Krause, Endothelial heterogeneity in the umbilico-placental unit: dna methylation as an innuendo of epigenetic diversity, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 49.
- [80] A. Korkmaz, J. Reiter, Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? *J. Pineal Res.* 44 (2008) 41–44.
- [81] T.H. Wu, H.C. Kuo, I.C. Lin, S.J. Chien, L.T. Huang, Y.L. Tain, Melatonin prevents neonatal dexamethasone induced programmed hypertension: histone deacetylase inhibition, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (2014) 253–259.
- [82] N. Mendez, L. Abarzua-Catalan, N. Vilches, H.A. Galdames, C. Spichiger, H.G. Richter, et al., Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light, *PLoS One* 7 (8) (2012) e42713.
- [83] C. Torres-Farfan, F.J. Valenzuela, M. Mondaca, G.J. Valenzuela, B. Krause, E.A. Herrera, et al., Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland, *J. Physiol.* 586 (16) (2008) 4017–4027.
- [84] M. Marcola, C.M. Lopes-Ramos, E.P. Pereira, E. Cecon, P.A. Fernandes, E.K. Tamura, et al., Light/dark environmental cycle imposes a daily profile in the expression of microRNAs in rat CD133(+) cells, *J. Cell. Physiol.* 231 (9) (2016) 1953–1963.
- [85] W. Ma, F. He, F. Ding, L. Zhang, Q. Huang, C. Bi, et al., Pre-treatment with melatonin enhances therapeutic efficacy of cardiac progenitor cells for myocardial infarction, *Cell. Physiol. Biochem.* 47 (3) (2018) 1287–1298.
- [86] J. Nie, P. Xiao, X. Wang, X. Yang, H. Xu, K. Lu, et al., Melatonin prevents deterioration in quality by preserving epigenetic modifications of porcine oocytes after prolonged culture, *Aging* 10 (12) (2018) 3897–3909.
- [87] Y. Fang, J. Zhang, Y. Li, X. Guo, J. Li, R. Zhong, et al., Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through ROR α in cumulus cells of prepubertal lambs, *Free Radic. Biol. Med.* 131 (2018) 173–183.
- [88] L.J. Renshall, H.L. Morgan, H. Moens, D. Cansfield, S.L. Finn-Sell, T. Tropea, et al., Melatonin increases fetal weight in wild-type mice but not in mouse models of fetal growth restriction, *Front. Physiol.* 9 (2018) 1141.
- [89] M. Castillo-Melendez, T. Yawno, A. Sutherland, G. Jenkin, E.M. Wallace, S.L. Miller, Effects of antenatal melatonin treatment on the cerebral vasculature in an ovine model of fetal growth restriction, *Dev. Neurosci.* 39 (1–4) (2017) 323–337.
- [90] A.P. Domínguez Rubio, F. Correa, J. Aisemberg, D. Dorfman, M.V. Bariani, R.E. Rosenstein, et al., Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice, *J. Pineal Res.* 63 (4) (2017).
- [91] Y.L. Tain, L.T. Huang, C.N. Hsu, Developmental programming of adult disease: Reprogramming by melatonin? *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2) (2017).
- [92] K.M. Groom, A.L. David, The role of aspirin, heparin, and other interventions in the prevention and treatment of fetal growth restriction, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 218 (2S) (2018) S829–S840.

El tratamiento postnatal con melatonina modula la expresión de agentes prostanoides en pulmón de neonatos de oveja con hipertensión pulmonar

SIMÓN A. AGUILAR^{1,a}, PAMELA V. ARIAS^{1,a},
IGNACIO CANQUIL^{1,a}, GERMÁN EBENSBERGER^{1,b,c},
ANÍBAL J. LLANOS^{1,2}, ROBERTO V. REYES^{1,b,c},
ALEJANDRO GONZÁLEZ-CANDIA^{1,c,f}, EMILIO A. HERRERA^{1,2,d,e}

Melatonin modulates the expression of pulmonary prostanoids

Background: Living above 2,500 meters in hypobaric conditions induces pulmonary arterial hypertension of the neonate (PAHN), a syndrome whose main features are: pathological remodeling of the pulmonary vessels, abnormal vascular reactivity and increased oxidative stress. Melatonin could have pulmonary antioxidant, anti-remodeling and vasodilating properties for this condition. **Aim:** To determine the effect of melatonin at the transcript level of prostanoid pathways in the lung of neonatal lambs gestated and born under hypobaric hypoxia. **Material and Methods:** Vehicle (1.4% of ethanol, n = 6) or melatonin (1 mg * kg⁻¹, n = 5) were administered from the postnatal day 4 to 21 to lambs gestated and born at 3,600 meters above sea level. After one week of treatment completion, lung tissue was obtained, the transcript and protein levels of prostanoid synthases and receptors were assessed by RT-PCR and Western Blot. **Results:** Melatonin induced the expression of prostacyclin synthase transcript and increased protein expression of the prostacyclin receptor. In addition, the treatment decreased the expression of transcript and protein of cyclooxygenase-2, without changes in the expression of the prostanoid vasoconstrictor (thromboxane) pathway. **Conclusions:** Postnatal treatment with melatonin increases the expression of the prostacyclin-vasodilator pathway without changing the vasoconstrictor thromboxane pathway. Further, the decreased COX-2 induced by melatonin could be an index of lesser oxidative stress and inflammation in the lung.

(Rev Med Chile 2019; 147: 281-288)

Key words: Hypoxia; Hypertension, Pulmonary; Newborn; Melatonin; Prostaglandins.

La hipertensión arterial pulmonar neonatal (HAPN) es una condición fisiopatológica definida como un aumento de la presión arterial pulmonar media sobre 25 mmHg, asociada a algún grado de hipoxemia como resultado de una inadecuada vasodilatación pulmonar al nacimiento^{1,2}. Esta condición clínica tiene una prevalencia

de hasta 7/1.000 nacidos vivos en tierras bajas, representando un grave problema clínico con alta morbimortalidad³. Sin embargo, su prevalencia es desconocida en alturas geográficas superiores a 2.500 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque se ha sugerido que podría alcanzar hasta 10% en recién nacidos vivos⁴.

¹Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, Programa de Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

²Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), Universidad de Chile. Putre, Chile.

^aEstudiante de Pregrado de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

^bBioquímico.

^cBioquímico, Lab Manager.

^dMedico Veterinario.

^ePhD.

^fMSc, PhD (c).

Fuente de Financiamiento:

Proyecto Fondecyt 1151119.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 1 de octubre de 2018, aceptado el 1 de abril de 2019.

Correspondencia a:

Emilio A. Herrera
Av. Salvador 486, Providencia.
Santiago, Chile.
eherrera@med.uchile.cl

Alejandro González-Candia
Av. Salvador 486, Providencia.
Santiago, Chile.
a.gonzalez@ciq.uchile.cl

La patogénesis de la HAPN se caracteriza por una disfunción endotelial, estrés oxidativo aumentado, aumento de parámetros inflamatorios y remodelamiento vascular patológico determinado por una hiperplasia e hipertrofia de la capa media, engrosamiento de la adventicia e íntima y un aumento de la matriz extracelular, provocando una vasorreactividad anormal tendiente a un tono vasoconstrictor⁵⁻⁷.

Entre los factores involucrados en la vasorreactividad pulmonar, destacan la vía dependiente de óxido nítrico (NO) y la vía prostanoide, las cuales tienen su acción en la musculatura lisa vascular pulmonar^{5,6,8}. Los prostanoideos se generan a partir de ácido araquidónico presente en membranas celulares, el cual es metabolizado por las enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1, isoforma constitutiva) o ciclooxigenasa-2 (COX-2, isoforma inducible), que sintetizan prostaglandina PGH₂^{8,9}. A partir de PGH₂ y la acción de sintasas específicas, se generan las prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, prostaciclina (PG_{I2}) y tromboxano (TX), cada una asociada a un receptor de membrana específico DP1, Ep1-4, FP₂, Ip y Tp, respectivamente^{9,10}.

Los agentes prostanoideos se pueden clasificar de acuerdo con su acción vasoactiva. En el primer grupo se encuentran las prostaglandinas vasodilatadoras PGD₂ y PGI₂, catalizadas por la prostaglandina D₂ sintasa (PGD_{2S}) y PGI₂ sintasa (PGI_{2S}), respectivamente. Los prostanoideos vasoconstrictores son PGF₂ producto de la prostaglandina F sintasa (PGF_{2S}), TX formado por tromboxano sintasa (TXS) y PGE₂ generado por la prostaglandina E sintasa (PGE_{2S}). Los prostanoideos vasodilatadores activan a la proteína Gs, actuando sobre la enzima adenilato ciclasa, generando AMPc, molécula que activa la proteína quinasa A (PKA), lo que finalmente disminuye la biodisponibilidad de Ca²⁺ intracelular asociado a una vasodilatación arterial. Por otro lado, los prostanoideos vasoconstrictores pueden activar dos tipos diferentes de proteína G. Los receptores Tp, Ep1 y FP₂ activan a la proteína Gq que permite la formación de IP3, movilizándolo desde el retículo sarcoplasmático al citosol, generando una activación de la maquinaria contráctil celular. En contraste, el receptor Ep3 activa la proteína Gi, que aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelulares al inhibir la acción de la adenilato ciclasa^{9,10}.

Se ha descrito un rol importante de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el aumento de la reactividad vasoconstrictora pulmonar asociado

a HTP^{11,12}. Asimismo, las ERO pueden unirse directamente al NO disminuyendo su biodisponibilidad^{5,13}. Finalmente, las ERO afectarán la relación normal de la arteria pulmonar en respuesta a vasodilatadores y favorecen el remodelamiento patológico¹³.

Actualmente existe solo un tratamiento aprobado por la *Food & Drug Administration* de Estados Unidos de Norteamérica para la HAPN, que consiste en la administración de NO inhalado, que induce una rápida y selectiva vasodilatación pulmonar¹⁴. Sin embargo, ensayos clínicos revelan que cerca de 40% de los pacientes no responden o responden parcialmente a esta terapia^{1,2}, por ello, nuevos tratamientos son necesarios para combatir esta condición. Por esta razón, en nuestra búsqueda de nuevos tratamientos para HAPN, hemos postulado a melatonina, que tiene propiedades vasodilatadoras, antioxidantes y antiremodelante en la circulación pulmonar neonatal^{15,16}. Estudios muestran diversos efectos de melatonina a nivel vascular, como mejorar la capacidad vasodilatadora y función endotelial pulmonar¹⁵, ser agente antirremodelante previniendo la excesiva proliferación de la túnica media^{16,17} y antioxidante, pudiendo neutralizar directamente a las ERO (*scavenger*)¹⁸. Además, se ha demostrado que melatonina induce la expresión del transcrito y/o proteínas de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa¹⁵, y también modula negativamente los mecanismos prooxidantes como la eNOS desacoplada y las lipooxigenasas¹⁸. Asimismo, se han descrito escasos efectos adversos exclusivamente durante la gestación^{19,20}. Sin embargo, aún se desconocen las vías vasodilatadoras pulmonares que son favorecidos por melatonina.

En este estudio se evaluó el efecto de la administración neonatal de melatonina sobre las vías prostanoideos pulmonares. Específicamente, se analizaron los efectos de melatonina en el nivel de transcrito y de proteína de sintasas y receptores de la vía prostanoide vasoconstrictora y vasodilatadora en tejido pulmonar de neonatos de ovejas con HAPN gestados, nacidos y criados en hipoxia crónica.

Material y Método

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de

Medicina de la Universidad de Chile (CBA#0761), además de seguir las indicaciones de las guías internacionales de cuidado y uso de animales en investigación y el reporte de sus resultados²¹.

Muestras biológicas

Para este estudio se utilizaron 10 corderos (*Ovis aries*) recién nacidos con hipertensión pulmonar, modelo caracterizado en estudios previos^{7,15,16,22,23}. Las ovejas madres de estos corderos concibieron y gestaron en hipoxia hipobárica en el Centro Internacional de Estudios Andinos de la Universidad de Chile (INCAS, Putre a 3.600 msnm). Al nacer, los corderos fueron estudiados y mantenidos con sus madres en el mismo centro de investigación. Los grupos experimentales se dividieron en: grupo control (C), tratados con vehículo (0,5 mL*kg⁻¹ de etanol al 1,4%, n = 5) y grupo tratado (M) con melatonina (Sigma-Aldrich código M5259, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; 1 mg*kg⁻¹ de melatonina en 1,4 % etanol, n = 5). Los tratamientos fueron administrados diariamente, vía

oral, a las 20 h, desde el día 4 al 21 postnatal. Para evaluar que los cambios fisiológicos atribuidos a melatonina perduraran en el tiempo, los corderos se mantuvieron por 7 días sin tratamiento (desde el día 22 al 28 postnatal). Finalmente, los animales fueron eutanasiados (tiopental sódico, Opet, Laboratorios PRO-VET, Santiago, Chile; 100 mg*kg⁻¹, vía endovenosa) a los 28 días de edad y se obtuvieron muestras de parénquima pulmonar, que fueron congeladas y mantenidas en nitrógeno líquido (-197°C) hasta su utilización.

Expresión de mRNA de sintasas y receptores de la vía prostanoide

La purificación de RNA en tejido pulmonar, síntesis de ADN complementario (cDNA) y la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se efectuó como se ha descrito previamente¹⁵. Para esto, se diseñaron partidores para la amplificación de los genes de ciclooxigenasas, agentes prostanoideos vasoconstrictores y vasodilatadores (Tabla 1).

Tabla 1. Partidores para la amplificación de los genes

Partidor	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Ciclos	Tamaño del amplicon (pb)
COX 1				
F	CTCATCGGGGAGACCATCAA	62,5	35	276
R	AGAAAAGCGCTCCACCAGG			
COX 2				
F	CAGAATGGGGCGATGAGC	62	35	204
R	GATGCCAGTGGTAGAGCGTG			
TX ₂				
F	CGGATTTTGCCCAATAAGA	59	33	192
R	AAAGACCTGACGGACGATG			
TP ₂				
F	GCGAGGTGGAGATGATGGT	62	33	257
R	GCTCAGGCGAGGGTAGAAG			
PGI ₂				
F	GGCTGGAGAGTTACCTGCTG	60	35	217
R	ATCTGTGAAATGGGCTGCTC			
IP				
F	GGTTGACCACCTGATTCTGC	60	33	192
R	ACGGACTTTCGGAAGAGGAT			
18s				
F	GTAACCCGTTGAACCCATT	58	20	152
R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG			

Abreviaturas: COX-1: ciclooxigenasa 1; COX-2 : ciclooxigenasa 2; TX₂: tromboxano sintasa; TP₂: receptor de tromboxano; PGI₂: prostaciclina sintasa; Ip: receptor de prostaciclina; F: partidor *forward*; R: partidor *reverse*.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 2% en *buffer* de tris, acetato y ácido etilendiaminotetraacético (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), y luego se visualizaron con luz ultravioleta y fotografiaron digitalmente. Finalmente, la imágenes se cuantificaron mediante densitometría con un programa computacional (Scion Image Beta 4.02 Win; Scion Corporation, MD, USA).

Expresión de proteína de sintasas y receptores de la vía prostanoideas

La extracción de proteína a partir de pulmón se realizó mediante homogenización mecánica en *buffer* RIPA como se describe en trabajos de Torres F et al y Astorga CA et al^{15,16}. Los lisados de proteína (1-40 µg según proteína) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (4% de gel concentrador y 10% de gel de corrida al 10%). La electroforesis se realizó en una cámara (Mini-PROTEAN Tetra Cell/ Blotting System, Bio-Rad, CA, USA), a un amperaje constante de 50 mA por 2 h aproximadamente. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 50 mV por 2 h. Finalmente, la expresión proteica de COX-1, COX-2, TXs, Tp, PGI₂, Ip y β-actina se realizó por *immunoblot* utilizando anticuerpos específicos: anti-COX-1, 160108; anti-COX-2, 160116; anti-Txs, 160715; anti-Tp, 101882; anti-PGI₂, 160640 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); anti-Ip (Sc-365268, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti β-actina (AC-15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La inmunodetección se realizó a través de anticuerpos secundarios conjugados con *horseradish-peroxidase* (HRP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-conejo o ratón, según corresponda. Posteriormente, la membrana fue montada en una cámara reveladora C-Digit Modelo 3600 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA), y se cuantificó la expresión proteica por densitometría clásica utilizando el programa Image Studio 3.1 Imaging Software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Las densidades de las señales fueron expresadas como razón de β-actina para normalizar por carga.

Análisis de datos

Los resultados se expresaron como promedio ± error estándar de la media. Se determinó la

distribución de la muestra mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre grupos se realizó por prueba de Mann Whitney (prueba no paramétrica del t test) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0,05$ (Prism 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)^{15,16}.

Resultados

Expresión de mRNA y proteína de ciclooxigenasas

La expresión de transcrito (mRNA) para COX-1 fue similar entre grupos (Figura 1A,C). En contraste, melatonina indujo una disminución significativa en la expresión de mRNA de COX-2 en comparación con el grupo control (Figura 1B,C). Con respecto a la expresión de proteínas de las ciclooxigenasas, no hubo cambios en los niveles de COX-1 entre los grupos analizados (Figura 1D, F). Sin embargo, el tratamiento con melatonina logró disminuir la expresión proteica de COX-2 (Figura 1E,F) en comparación con el grupo control.

Expresión de mRNA y proteína de la vía vasoconstrictora prostanoide

Los niveles de expresión de la sintasa de tromboxano (TXs) a nivel de transcrito (Figura 2 A,C) y de proteína (Figura 2 D, F) no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados. A la vez, tampoco se observaron diferencias entre grupos en la expresión proteica (Figura 2 E, F) o nivel de transcrito (Figura 2 B, C) del receptor de tromboxano (Tp).

Expresión de mRNA y proteína de la vía vasodilatadora prostanoide

El tratamiento con melatonina indujo un aumento significativo en la expresión de transcrito de la prostaciclina sintasa (PGI₂s) en comparación al grupo control (Figura 3 A, C), aunque a nivel de su receptor Ip no se observaron diferencias significativas a nivel de transcrito (Figura 3 B, C). En contraste, no se observaron cambios en la expresión proteica de la sintasa de prostaglandina PGI₂ (Figura 3 D, F), mientras que el tratamiento con melatonina aumentó de manera significativa la expresión proteica del receptor Ip (Figura 3 E, F) en comparación con el grupo control.

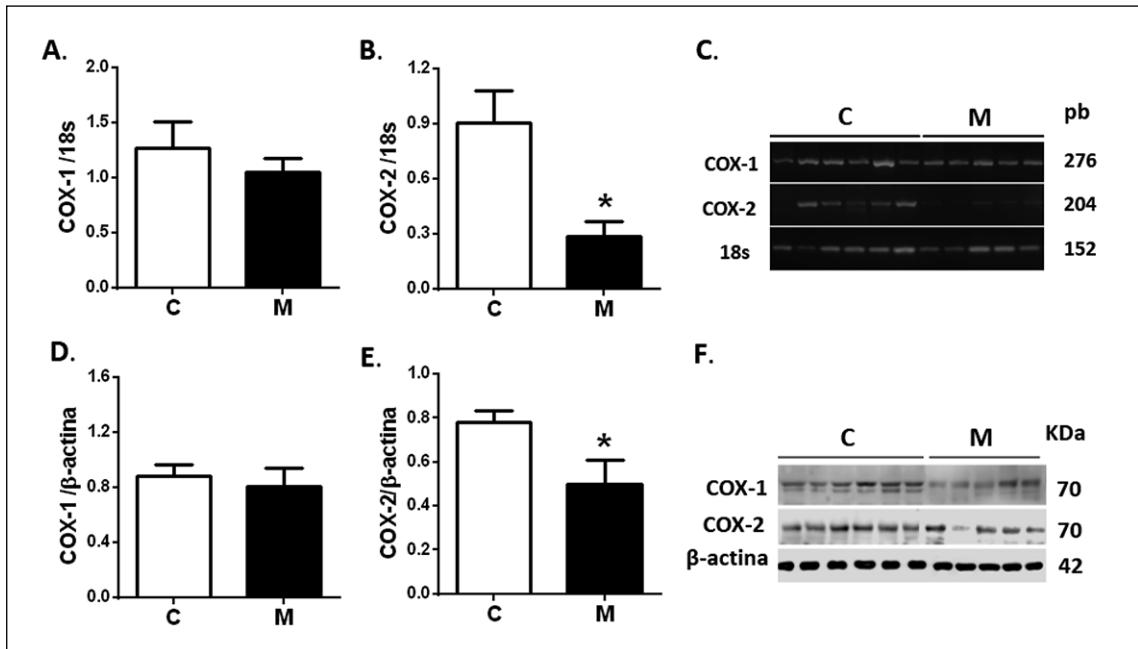


Figura 1. Niveles de transcrito y proteína de ciclooxigenas. Los resultados se expresan como promedio \pm E.S.M. de mRNA para COX-1 (A) y COX-2 (B) y proteína para COX-1 (D) y COX-2 (E). Se muestran imágenes representativas de los ensayos de RT-PCR (C) y Western blot (F). Los grupos son control (C, n = 6, barras blancas) y tratados con melatonina (M, n = 5, barras negras). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) = *vs C.

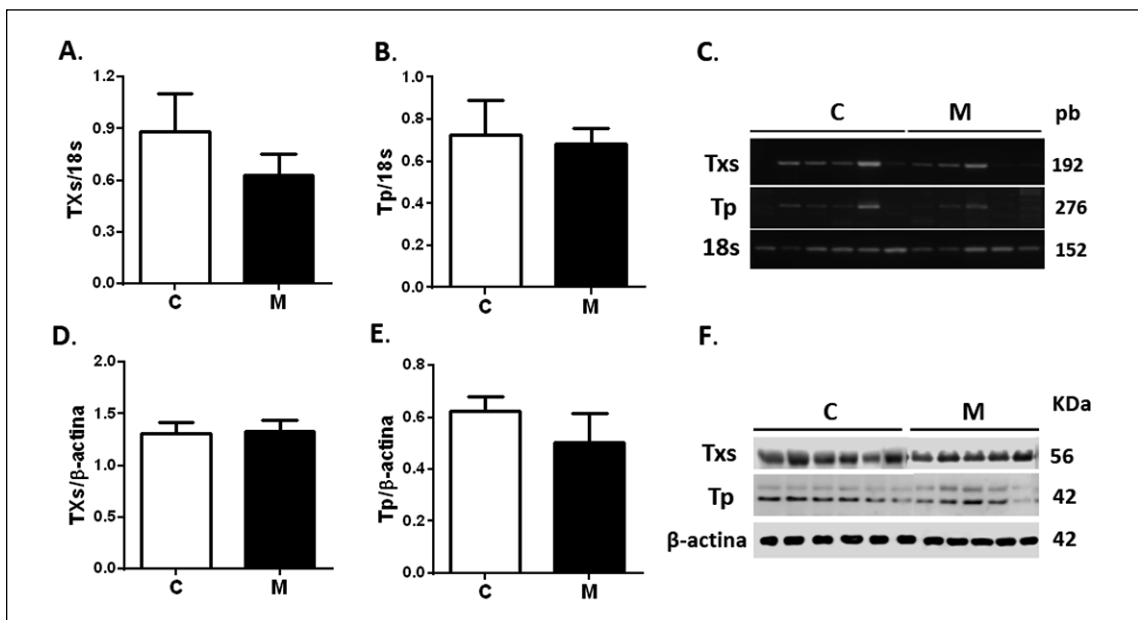


Figura 2. Niveles de expresión de la sintasa y receptor de tromboxano. Los resultados se expresan como promedio \pm E.S.M. de mRNA para TXs (A), Tp (B) y proteína de TXs (D) y Tp (E). Se muestran imágenes representativas de los ensayos de RT-PCR (C) y Western blot (F). Los grupos son control (C, n = 6, barras blancas) y tratados con melatonina (M, n = 5, barras negras). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) = *vs C.

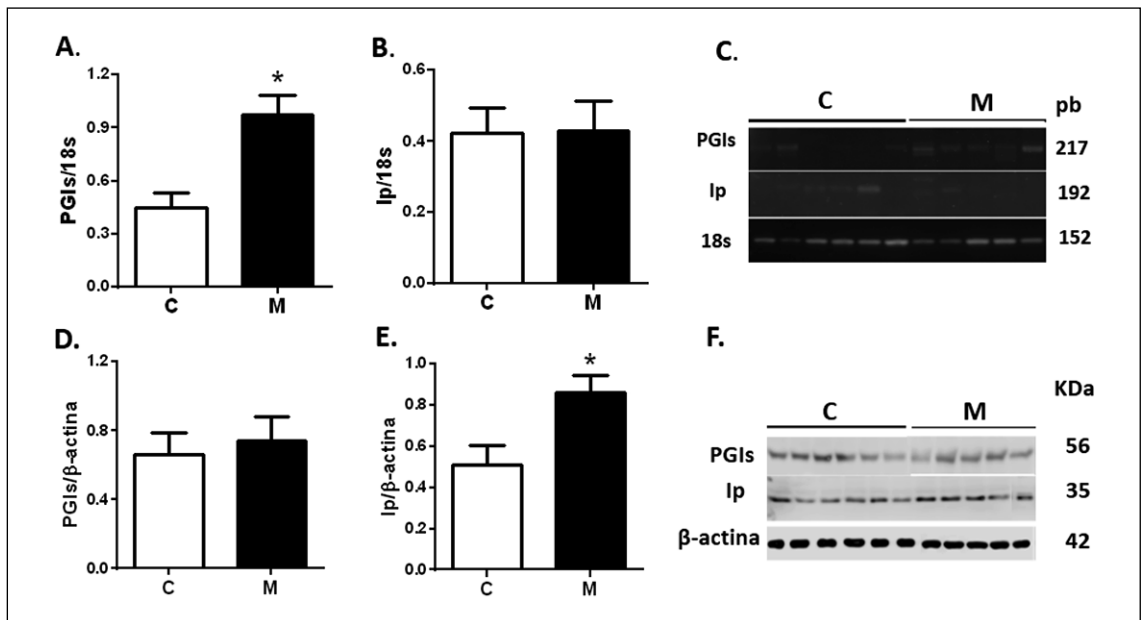


Figura 3. Niveles de expresión de la sintasa y receptor de prostaciclina. Los resultados se expresan como promedio \pm E.S.M. de mRNA para PGIs (A), Ip (B) y proteína de PGIs (D) y Ip (E). Se muestran imágenes representativas de los ensayos de RT-PCR (C) y Western blot (F). Los grupos son control (C, n = 6, barras blancas) y tratados con melatonina (M, n = 5, barras negras). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) = *vs C.

Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que un tratamiento con melatonina durante las primeras tres semanas de vida con una dosificación farmacológica diaria de $1 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ logró modular de manera diferencial la expresión de las vías prostanoideas en pulmón de corderos. En primer lugar, melatonina logró disminuir a nivel de transcrito y de proteína la COX-2 sin cambios en la expresión de COX-1. Se ha demostrado que la expresión de COX-2 (forma inducible de las ciclooxigenasas) aumenta en diferentes condiciones fisiopatológicas, como estrés oxidativo, cuadros inflamatorios y proliferación celular asociada a crecimiento tumoral en diferentes tejidos^{8,24,25}. Por lo tanto, una disminución de la COX-2 podría ser indicador de menor estrés oxidativo e inflamación pulmonar. Con respecto a lo anterior, se ha demostrado que melatonina disminuye el estrés oxidativo y la presión pulmonar en neonatos^{15,16} y adultos²⁶ de modelos animales. Los efectos antioxidantes de melatonina están asociados a sus características de: 1) *scavenger* de radicales

libres, 2) inducción de la maquinaria enzimática antioxidante y 3) disminución de la expresión de enzimas prooxidantes²⁷, lo cual disminuye el tono oxidativo en el territorio pulmonar^{15,17,18}. Además, melatonina puede modular la producción de diferentes mediadores inflamatorios como TNF- α vía receptor, disminuyendo de esta forma el tono inflamatorio a nivel celular y la sobreexpresión de COX-2²⁸⁻³⁰. Por otro lado, se ha visto que la ausencia de COX-2 trae como consecuencia una exacerbación de la hipertensión pulmonar y del remodelamiento patológico³¹, sin embargo, estos estudios solo modifican la expresión genética de COX-2, sin modificar otros parámetros involucrados en la vasoreactividad.

Se ha demostrado que la administración de melatonina normaliza la sobreexpresión de COX-2, TNF- α e iNOS disminuyendo, además, los niveles de NF- κ B en células cultivadas y modelos animales³⁰. En este sentido es relevante destacar que la acción de melatonina tiende a normalizar los parámetros inflamatorios y permitir una expresión a un nivel similar al fisiológico de COX-2.

En términos del balance vasoactivo que pre-

senta el lecho pulmonar, el cuadro clínico de la HAPN se caracteriza por presentar un marcado aumento de los vasoconstrictores a nivel pulmonar^{13,14}. Si bien este trabajo no mostró diferencias en la expresión a nivel de mensajero ni de proteína de la vía dependiente de tromboxano (TXs-Tp), sí mostró un aumento del transcrito en la expresión de sintasa PGI₂, la cual favorece un balance prostanoide vasodilatador^{24,25}. Interesantemente, además, melatonina indujo un aumento de la expresión del receptor Ip, favoreciendo la acción vasodilatadora de PGI₂.

La hipertensión pulmonar posee un componente inflamatorio²⁵, y en base a esto, se ha demostrado que melatonina es capaz de inhibir las traslocación y acción transcripcional del NFκ-B^{29,32} que, a su vez, activa el factor TNF-α, suprimiendo la expresión del transcrito de PGIs³². Asimismo, la acción antioxidante y antiinflamatoria de melatonina estaría inhibiendo la traslocación al núcleo de NFκ-B, impidiendo la activación de TNF-α, lo que conduciría a un aumento en los niveles de transcrito de PGIs. A nivel proteico, melatonina logró inducir la expresión del receptor Ip sin cambiar la sintasa de prostaciclina PGIs, lo que sugiere un aumento en la sensibilidad de la respuesta vasodilatadora de PGI₂. La actividad de PGIs y el efecto de PGI₂ debiese ser foco de estudio en futuras investigaciones para confirmar esta sugerencia.

La HPTN se asocia a una alteración de la respuesta vascular pulmonar, comandada principalmente por el endotelio y las células musculares lisas. Si bien este trabajo solo estudió el efecto de melatonina en la vasorreactividad mediada por prostanooides, esta vía junto a la oxidonitrérgica son las principales responsables de mantener el tono a nivel vascular. Estudios previos han demostrado que una administración aguda de melatonina logra aumentar *ex vivo* la vasodilatación dependiente de óxido nítrico, además de inducir una respuesta vasodilatadora mediada por alguna vía independiente de óxido nítrico en arterias de resistencia pulmonar¹⁵.

Existe un amplio rango de dosis de melatonina (0,0005 - 100 mg totales) descrito en la literatura, en los cuales no se han visto efectos adversos. En este sentido, este trabajo continúa la exploración de mecanismos vasoactivos realizada por trabajos anteriores^{15,16}, los que mostraron efectos del tratamiento mejorando el estrés oxidativo y la función vascular.

Se concluye que el tratamiento postnatal con melatonina oral induce efectivamente la expresión de agentes prostanooides vasodilatadores, lo que ayudaría a contrarrestar la disfunción endotelial caracterizada por un predominio del tono vasoconstrictor propio del cuadro clínico de la HAPN.

De este estudio se infiere que el uso de melatonina tiene potenciales usos terapéuticos en la HAPN. Los efectos a nivel pulmonar persisten en el tiempo, a pesar del término de la administración del tratamiento. Por ello, consideramos que melatonina podría ser una potencial terapia coadyuvante para el tratamiento de esta patología.

Agradecimientos: Nuestros agradecimientos para los Srs. Carlos Brito, Gabino Llusco y René Vergara por la excelente asistencia técnica.

Referencias

- Jain A, McNamara PJ. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Advances in diagnosis and treatment. *Semin Fetal Neonatal Med* 2015; 20 (4): 262-71.
- Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatr* 2000; 105: 14-20.
- Keyes LE, Armaza JF, Niermeyer S, Vargas E, Young DA, Moore LG. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res* 2003; 54 (1): 20-5.
- Peñaloza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation* 2007; 115 (9): 1132-46.
- Tabima D, Frizzell S, Gladwin M. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pulmonary Hypertension. *Free Radic Biol Med* 2012; 52 (9): 1970-86.
- Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, Tuder RM. Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2018; 114(4): 551-564.
- Herrera EA, Ebensperger G, Krause BJ, Riquelme RA, Reyes RV, Capetillo M, et al. Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep. *Pediatr Res* 2008; 63 (2): 169-75.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-82.

9. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* 1999; 79 (4): 1193-226.
10. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36 (7): 1187-205.
11. Jernigan NL, Naik JS, Weise-Cross L, Detweiler ND, Herbert LM, Yellowhair TR, et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE* 2017; 12 (6): e0180455.
12. Jaitovich A, Jourdeuil D. A brief overview of nitric oxide and reactive oxygen species signaling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2017; 967: 71-81.
13. Wedgwood S, Steinhorn RH. Role of Reactive Oxygen Species in Neonatal Pulmonary Vascular Disease. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21 (13): 1926-42.
14. Nair J, Lakshminrusimha S. Update on PPHN: mechanisms and treatment. *Semin Perinatol* 2014; 38 (2): 78-91.
15. Torres F, González-Candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Serón-Ferré M, et al. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res* 2015; 58 (3): 362-73.
16. Astorga CA, González-Candia A, Candia AA, Figueroa EG, Cañas D, Ebensperger G, et al. Melatonin decreases pulmonary vascular remodeling and oxygen sensitivity in pulmonary hypertensive newborn lambs. *Front Physiol* 2018; 9: 185.
17. Galano A, Tan D, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011; 51: 1-16.
18. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27 (2): 119-30.
19. González-Candia A, Veliz M, Araya C, Quezada S, Ebensperger G, Serón-Ferré M, et al. Potential adverse effects of antenatal melatonin as a treatment for intrauterine growth restriction: findings in pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215 (2): 245.e1-7.
20. Renshall LJ, Morgan HL, Moens H, Cansfield D, Finn-Sell SL, Tropea T, et al. Melatonin Increases Fetal Weight in Wild-Type Mice but Not in Mouse Models of Fetal Growth Restriction. *Front Physiol* 2018; 9: 1141.
21. Grundy D. Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *J Physiol* 2015; 593 (12): 2547-9.
22. Herrera EA, Macchiavello R, Montt C, Ebensperger G, Díaz M, Ramírez S, et al. Melatonin improves cerebrovascular function and decreases oxidative stress in chronically hypoxic lambs. *J Pineal Res* 2014; 57 (1): 33-42.
23. Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, Sanhueza EM, Reyes VR, Ebensperger G, et al. High altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292 (6): 2234-40.
24. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, Fitzgerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res* 2009; 50 (Suppl): S423-S428.
25. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012; 141 (1): 210-21.
26. Hung MW, Yeung HM, Lau CF, Poon AMS, Tipoe GL, Fung ML. Melatonin attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (6): E1125.
27. González-Candia A, Veliz M, Carrasco-Pozo C, Castillo RL, Cárdenas JC, Ebensperger G, et al. Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Redox Biol* 2019; 22: 101128.
28. Favero G, Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammation Activation. *Int J Endocrinol* 2017; 2017: 1835195.
29. Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J Pineal Res* 2012; 53 (1): 77-90.
30. Tripathi DN, Jena GB. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *J Pineal Res* 2010; 48 (4): 324-31.
31. Fredenburgh LE, Liang OD, Macias AA, Polte TR, Liu X, Riascos DF, Perrella MA. Absence of COX-2 exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances contractility of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2008; 117 (16): 2114-22.
32. Itoh A, Nishihira J, Makita H, Miyamoto K, Yamaguchi E, Nishimura M. Effects of IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Respirology* 2003; 8 (4): 467-72.