

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



**Efectos del tratamiento con suramina en la capacidad  
para realizar ejercicio y contractibilidad de venas  
intrapulmonares pequeñas en modelo animal de  
hipertensión pulmonar**

**MARISOL JOSEFA BARROS POBLETE**

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

Director de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Henríquez L.

**2018**

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

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

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

**MARISOL JOSEFA BARROS POBLETE**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magíster en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Julio de 2018.

**Prof. Dr. Mauricio Henríquez L.**

**Director de Tesis**

**Programa de Fisiología, ICBM Programa de Fisiopatología, ICBM**

**Facultad de Medicina, Universidad de Chile Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Prof. Dra. Emilia Sanhueza

Prof. Dra. Zully Pedrozo

Prof. Dra. Mariana Casas

Prof. Dr. Marcelo Cano  
Presidente comisión de examen

A mi

marido: mejor amigo y compañero, que me entregó su tiempo,  
paciencia y cariño; cada uno de mis logros se  
sustentan en tu apoyo incondicional.

Gracias por creer siempre en mí.

A mi profesor y mentor:

Su ejemplo me llama a ser cada día más  
y sus consejos me permitieron sobrellevar  
un sin número de dificultades.

## **Agradecimientos**

Agradecer en primer lugar al Dr. Mauricio Henríquez sin duda fue el mejor guía que podría haber elegido en este proceso formativo. Gracias por enseñarme a aprender y apoyarme en los momentos más complejos.

Agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares: Marcelo Fonseca, Dra. Carol San Martín, Dra. Nicole Rogers, Santiago Ramírez, Carolina Orellana, Roque Basoalto, Camilo Villaroel, Francisca Vargas y Don Cristian que me capacitaron, asistieron y ayudaron en los procedimientos; que me corrigieron y escucharon desde el primer día hasta las últimas preparaciones para la defensa, que me acompañaron durante en el día a día, dándome ánimo, consuelo y buenas vibras, fueron un apoyo incondicional sin el cual esto no hubiera sido posible.

Al laboratorio de la Dra. Mariana Casas, donde me recibieron y apoyaron en todo lo que me faltaba haciéndome sentir una de ellos, en especial a la misma Dra. Mariana y Carlos Chacón.

Agradecer a los docentes de la escuela de Kinesiología de la Universidad de Chile Prof. Edgardo Opazo, Prof. Dr. Marcelo Cano y Prof. Rodrigo Torres sus correcciones y aportes al proceso teórico fueron esenciales.

A la Dra. Emilia Sanhueza y Dra. Zully Pedroso, sus correcciones y aportes permitieron que esto fuera posible.

A mis amigos y familia, que fueron incondicionales.

Gracias, por tanto.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP:	Adenosín Trifosfato
ADP:	Adenosín difosfato
CC:	Capacidad cardiorrespiratoria
DAG:	Diacilglicerol
eNOS:	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
EDHF:	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
ET:	Endotelina
FDA:	Food and Drug Administration
GMPC:	Guanosín Monofosfato Cíclico
HP:	Hipertensión Pulmonar
HAP:	Hipertensión Arterial Pulmonar
HVP:	Hipertensión Venosa Pulmonar
IP3:	Inositol 1,4,5-Trifosfato
MCT:	Monocrotalina
MLC:	Cadena Liviana de la Miosina
MLCK:	Kinasa de la Cadena Liviana de la Miosina
MLCP:	Fosfatasa de la Cadena Liviana de la Miosina
ON:	Óxido Nítrico
PAH:	Pulmonary arterial hypertension
PAP:	Presión de Arteria Pulmonar
PAPm:	Presión de Arteria Pulmonar Media
PC:	Prostaciclina
PKA:	Proteína Kinasa A
PKC:	Proteína Kinasa C
PKG:	Proteína Kinasa G
PMCA:	Bomba de Calcio de la Membrana Plasmática
PTDVI:	Presión Telediastólica del Ventrículo Izquierdo
RVP:	Resistencia Vascular Pulmonar
SERCA:	Bomba Calcio-ATPasa del retículo sarcoplasmático

UTP: Uridín Trifosfato  
UDP: Uridín Difosfato  
VO<sub>2</sub>max: consumo máximo de oxígeno

## ÍNDICE

RESUMEN .....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN .....	10
I. Hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar .....	10
II. Fisiología de la contracción muscular lisa vascular y tratamiento hap.....	11
III. Señalización purinérgica en el tono vascular pulmonar y HAP .....	12
IV. Señalización purinérgica en otros sistemas .....	15
V. Contribución del sistema venoso a la resistencia vascular pulmonar.....	16
VI. Modelo experimental de HAP inducida por monocrotalina.....	16
VII. Suramina .....	17
VIII. Capacidad cardiorrespiratoria e hipertensión arterial pulmonar.....	18
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS .....	20
MÉTODOS .....	21
I. Animales .....	21
II. Procedimiento .....	21
A. Test de capacidad cardiorrespiratoria .....	22
B. Escala de Morton & Griffiths.....	23
C. Eutanasia.....	23
D. Rebanas de pulmón corte preciso (PCLS) e Índice de Fulton.....	24
E. Estudios de vaso-reactividad en venas pequeñas .....	24
III. Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS .....	25
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES .....	44
LIMITACIONES .....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS .....	52

## RESUMEN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad crónica, progresiva y fatal que, a pesar del desarrollo de nuevas drogas, continúa siendo incurable. Las tres vías de tratamientos farmacológicos actuales apuntan a la regulación del tono vascular con el objeto de reducir la resistencia vascular pulmonar, siendo uno de los grandes pilares para dosificar la terapia la capacidad cardiorrespiratoria del paciente, lo cual es evaluado por medio de test cardiopulmonar y test de marcha 6 minutos.

Hoy en día, existe evidencia que sugiere fuertemente la participación de los receptores purinérgicos, tanto como un elemento patológico que contribuye al desarrollo de la enfermedad, como también una nueva alternativa terapéutica. En este contexto es que la suramina, al ser un inhibidor inespecífico de los receptores purinérgicos y una droga aprobada por la FDA, se convierte en una real alternativa para explorar la terapia antipurinérgica.

Es por lo anterior, que nuestro objetivo fue evaluar los efectos que tiene ese medicamento a nivel de la capacidad cardiorrespiratoria en un modelo animal de HAP, cómo influye en la sobrevida de los animales y además los efectos que pueda producir a nivel de la contractibilidad de las venas intrapulmonares pequeñas. Para ello se diseñó un estudio con 4 grupos experimentales: dos controles y dos hipertensos, con y sin tratamiento respectivamente. Nuestros resultados demuestran que es posible evaluar la capacidad cardiorrespiratoria de los animales; y que ésta disminuye en ratas HAP inducidas con Monocrotalina (MCT) a partir del día 23 posterior a la inyección. Esta disminución en la capacidad cardiorrespiratoria no se observó en las ratas HAP que recibieron el tratamiento con suramina. Además, en estudios *post mortem* se evaluó la hipertrofia ventricular derecha a través del índice de Fulton, siendo ésta significativamente menor en el grupo HAP con tratamiento con suramina en comparación con el grupo sin tratamiento, esto además se vio acompañado por una disminución de la contractibilidad a ATP de las venas pulmonares pequeñas en las ratas HAP con suramina. Todo lo anterior determinó un aumento de la sobrevida en el grupo que recibió el tratamiento.



## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic, progressive and fatal disease that, despite the development of new drugs, remains incurable. The three routes of current pharmacological treatments point to the regulation of vascular tone in order to reduce pulmonary vascular resistance, being one of the main pillars to dose therapy is the cardiorespiratory capacity of the patient, which is evaluated by cardiopulmonary test and 6 minute walk test.

Nowadays, evidence that strongly suggests the participation of purinergic receptors, both as a pathological element that contributes to the development of the disease, and as a new therapeutic alternative. In this context, suramin, being a nonspecific inhibitor of purinergic receptors and an FDA approved drug, becomes a real alternative to explore as pharmacological therapy.

Therefore, our objective was to evaluate the effects of this drug on the level of cardiorespiratory fitness in an animal model of PAH, how it influences the survival of the animals and, also, the effects that may occur at the level of contractility of the animals in small intrapulmonary veins. We designed a study with 4 experimental groups, two controls and two hypertensive patients, with and without treatment respectively. Our results show that it is possible to evaluate the cardiorespiratory capacity in this animal model; and that it decreases as a function of time in PAH rats induced with Monocrotaline (MCT) from day 23 after injection. This decrease in cardiorespiratory fitness was not observed in the PAH rats that received treatment. In addition, post-mortem studies evaluated the Fulton index, which denotes right ventricular hypertrophy, which was significantly lower in the PAH group treated with suramin compared with the PAH group, this was also accompanied by a decrease in the contractibility to ATP of small pulmonary veins. All of the above determined an increase in survival in the group that received the treatment.

## INTRODUCCIÓN

### I. HIPERTENSIÓN PULMONAR E HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

Se define hipertensión pulmonar (HP) como un aumento de la presión media de la arteria pulmonar mayor a 25 mmHg (PAPm > 25 mmHg), siendo el límite superior de normalidad de 20 mmHg [Barbera et al. 2017, Galie et al. 2015, Zagolín et al., 2016].

La HP se clasifica en 5 grupos, según la clasificación de Niza 2013 [Galiè et al. 2013]:

- Grupo 1: Hipertensión arterial pulmonar (HAP).
- Grupo 2: Hipertensión pulmonar secundaria a enfermedades cardiacas izquierdas.
- Grupo 3: Hipertensión pulmonar secundaria a enfermedades pulmonares o hipoxia.
- Grupo 4: Hipertensión pulmonar por enfermedad tromboembólica crónica.
- Grupo 5: Hipertensión pulmonar asociada a mecanismos multifactoriales.

De ellas el grupo 1, HAP presenta además de una PAPm > 25 mmHg, una presión capilar pulmonar o de enclavamiento menor de 15mmHg y un aumento de la resistencia vascular pulmonar mayor a 3 unidades de Wood, en ausencia de otras enfermedades que causen HP precapilar [Barbera et al. 2017, Galie et al. 2015, Zagolín et al., 2016].

Los síntomas que presentan los pacientes con HAP son inespecíficos y entre ellos encontramos: disnea, fatiga, dolor torácico, síncope, disminución de la capacidad para caminar, realizar actividades de la vida diaria y sensación de palpitaciones [Barbera et al., 2017, Zagolín et al., 2016]. Por ello cuesta diferenciarlos de otras enfermedades respiratorias, lo que demora el diagnóstico. La HAP es una enfermedad crónica, progresiva, de baja prevalencia pero de alto impacto por su curso grave y letal [Zagolín et al., 2016].

En Chile se desconoce la cantidad de pacientes con HAP. En la guía clínica nacional, haciendo una extrapolación de la prevalencia en otros países (25-50 pacientes por millón de habitantes), se estimó que se pueden encontrar entre 400 y 850 pacientes con HAP y que habría 30 casos nuevos al año en nuestro país [Zagolín et al., 2016]. Por otro lado, las estadísticas internacionales destacan que la proporción de pacientes con HAP entre mujeres y hombres es de 1,9:1[Gall et al., 2017], que presentan en promedio 45 años  $\pm$  17 años [Barbera et al. 2017] y con una sobrevida media de 3,8 a 5,6 años, siendo la principal causa de muerte la falla cardiaca derecha [Gall et al., 2017].

Una vez efectuado el diagnóstico de HAP, el paciente comienza a recibir terapia acorde a su etiología, capacidad funcional y estratificación de riesgo [Zagolín et al., 2016]. A diferencia de los otros tipos de HP, el tratamiento en la HAP no está enfocado en subsanar el factor causante de la HP, ya que aún se desconoce, sino que al existir aumento de la resistencia vascular pulmonar (RVP) está enfocado en modular el tono vascular pulmonar. Hoy existen tres pilares de tratamiento basados en los factores endoteliales que estarían involucrados en la vasodilatación o vasoconstricción del territorio pulmonar: óxido nítrico (ON), prostaciclina (PC) y endotelinas (ET) [Zagolín et al., 2016, Galie et al. 2013, Ataya 2016].

## II. FISIOLÓGIA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR LISA VASCULAR Y TRATAMIENTO HAP

La contracción del músculo liso se inicia por un aumento de la concentración intracelular de calcio, el cual se combina con la proteína calmodulina. Este complejo calcio-calmodulina activa a la proteína quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK) lo cual permitirá aumentar su actividad de ATPasa, que a su vez determinará su capacidad para unir miosina y formar puentes cruzados. El aumento del calcio intracelular proviene de reservorios intracelulares como el retículo sarcoplasmático o bien desde el extracelular a través de canales de calcio. Entre los agonistas que permiten aumentar el calcio encontramos la ET, la cual difunde desde la célula endotelial a la célula muscular lisa uniéndose a sus receptores (A y B), los cuales están acoplados a proteína Gq y con ello estimulan la actividad de la fosfolipasa C, la que a su vez cataliza la formación de IP<sub>3</sub> y DAG. La unión del IP<sub>3</sub> al receptor IP<sub>3</sub> del RS resulta en la liberación de calcio al citosol. A su vez DAG activa a la proteína quinasa C (PKC), la cual promueve la fosforilación de canales de calcio tipo L que permiten el ingreso del calcio desde el extracelular [Webb et al. 2003]. El tratamiento de la HAP por la vía de las endotelinas implica administrar antagonistas para los receptores de éstas como lo son el Bosentán, Ambrisentán y Macitentan [Bevacqua et al, 2013].

En contraposición a lo anterior, la relajación del músculo liso requiere la disminución del calcio intracelular lo que produce un aumento de la actividad de la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MLCP). Entre los mecanismos involucrados para producir esto, se encuentra la bomba Calcio-ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA). Cuando la SERCA se encuentra fosforilada, une dos iones de calcio, los cuales son traslocados al interior del RS disminuyendo el calcio citosólico. Asimismo, la ATPasa plasmática de membrana también contribuye a este

proceso [Webb et al., 2003]. Una de las vías de la vasodilatación del músculo liso que mejor se encuentra caracterizada es el ON. Éste es producido a través de la conversión enzimática de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El ON difunde a la célula muscular lisa, donde activa una guanilatociclasa que produce GMPc a partir de GTP lo cual activa una proteína quinasa G (PKG) que a su vez fosforila a la MLCP para que desforile a MLC y con ello se produce una relajación de la fibra muscular lisa. Entre los medicamentos que actúan a través de este mecanismo encontramos la familia de los inhibidores de la fosfodiesterasas 5 (por ejemplo, sildenafil o tadalafil), los cuales, al inhibir esta enzima producen que el GMPc permanezca más tiempo en el citosol, favoreciendo la vasodilatación de la célula muscular. También encontramos otros medicamentos como el Riociguat, un agonista de la guanilato ciclasa [Galie et al., 2013]. Asimismo, las PC producidas por la degradación enzimática del ácido araquidónico poseen un efecto vasodilatador y actúan a través de la activación de la adenilciclasa, con el aumento posterior de AMPc y con la consiguiente activación de la proteína quinasa A (PKA) quien, al igual que la PKG, actúa sobre la MLCP produciendo la relajación de músculo liso [Gao et al., 2005]. Entre los medicamentos que actúan por esta vía encontramos análogos de PC como son epoprostenol, iloprost o trepostini [Bevacqua et al, 2013].

Los pacientes que no respondan a la terapia inicial luego de tres meses, deben escalar a terapia combinada (bi-asociada) y si aun así no hay una mejora clínica satisfactoria se procede a la terapia tri-asociada. Esta terapia de tipo escalonada se denomina “terapia guiada por objetivos” y para determinar el paso de un escalón a otro se debe considerar: clase funcional de la OMS, distancia recorrida en el test de marcha de 6 minutos, parámetros ecocardiográficos, pro-BNP y consumo *peak* de oxígeno en test cardiopulmonar [Galie et al. 2015, Zagolín et al. 2016].

A pesar del tratamiento adecuado, la HAP sigue siendo una enfermedad con mal pronóstico una vez que se diagnostica, por lo cual es necesaria la investigación de nuevas alternativas terapéuticas [Ataya 2016].

### III. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN EL TONO VASCULAR PULMONAR Y HAP

Las purinas (adenosina, ATP y ADP) y pirimidinas extracelulares (UDP y UTP) son moléculas de señalización que median diversos procesos biológicos. Los nucleótidos ejercen sus efectos a través de los llamados receptores purinérgicos, de los cuales se han identificado

dos familias: P1 o receptores de adenosina y receptores P2, que reconocen tanto purinas como pirimidinas con distinta afinidad. Estos receptores se han encontrado en el sistema vascular expresados en el corazón, en la circulación coronaria, nervios perivasculares, células endoteliales y células sanguíneas [Burnstock et al. 2014]. Los receptores de la familia P2 están divididos en P2X, que son receptores ionotrópicos y que actúan como un canal catiónico no selectivo, causando una despolarización de membrana por influjo de calcio. De ellos encontramos siete subtipos de receptores P2X<sub>1-7</sub> todos los cuales responden solo a ATP con diferentes sensibilidades, siendo P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>4</sub> los principales receptores expresados en el músculo liso vascular [Ralevic et al. 2015]. El otro grupo de receptores son los receptores P2Y, los cuales están acoplados a proteína G y se han identificado ocho distintos, que pueden ser clasificados según su diferente afinidad con nucleótidos [Burnstock et al. 2017]. El receptor P2Y<sub>1</sub> responde a ADP más que ATP; P2Y<sub>2</sub> responde a ATP y UTP; P2Y<sub>4</sub> responde solo a UTP pero según algunos artículos puede también responder a ATP [Chootip K et al. 2005]; P2Y<sub>6</sub> responde a UDP y UTP; P2Y<sub>11</sub> a ATP; P2Y<sub>12-13</sub> responden a ADP; y P2Y<sub>14</sub> a UDP glucosa y UDP [Burnstock et al. 2017, Ralevic et al. 2015]. El músculo liso vascular expresa diferentes combinaciones de P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>. También están presentes en las células endoteliales principalmente P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> [Ralevic et al. 2015].

Las principales fuentes ATP, y otros nucleótidos, son los eritrocitos y el endotelio, que a través de la estimulación vía receptores P2Y producen vasodilatación para aumentar el flujo sanguíneo en respuesta a la hipoxia en los vasos sistémicos. También son fuente las plaquetas y el músculo liso dañado [Ralevic et al. 2015].

La señalización purinérgica en el tono vascular, ejerce diferentes funciones según dónde se ubique, endotelio o músculo liso, pudiendo provocar vasodilatación o vasoconstricción, respectivamente. La activación de los receptores P2Y en el endotelio produce la liberación de ON, PC y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) hacia el músculo liso produciendo vasodilatación en este [Ralevic et al., 2015]. Existe evidencia que en situaciones patológicas los receptores P2 también pueden estar actuando, en particular cuando existe disfunción del endotelio existiendo una agregación plaquetaria y la acumulación de leucocitos en el tejido dañado los cuales pueden liberar ATP, ADP y UTP en forma excesiva, ejerciendo acciones vasoconstrictoras vía receptores P2 presentes en el músculo liso vascular [Ralevic et al. 2015]. Además, las señales purinérgicas pueden mediar fenómenos tróficos y de proliferación

en el músculo liso, por ejemplo, P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> son mediadores de la proliferación de las células musculares lisas de aorta de rata [Burnstock et al. 2017]. Asimismo, la estimulación de los receptores P2Y<sub>1</sub> en células endoteliales activa el VEGF produciendo angiogénesis [Ralevic et al. 2015]. Es importante mencionar que el rol de la señalización purinérgica sobre el tono vascular, se ha generado casi exclusivamente en base a estudios realizados en vasos sistémicos. La evidencia a nivel pulmonar se limita principalmente a arterias pulmonares de rata, donde se ha demostrado que tanto ATP, UDP y UTP evocan contracción, observándose una mayor respuesta a ATP, lo cual estaría explicado debido a que sería la resultante de la activación tanto de los receptores P2X como P2Y [Mitchell et al., 2012]. Esta respuesta contráctil inducida por ATP es inhibida por suramina [Chootip et al. 2005]. Además, gracias al uso de antagonistas específicos, se ha visto que la respuesta a ATP estaría mediada en gran parte por P2X<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> a nivel arterial [Mitchell et al. 2012]. Asimismo, en venas intrapulmonares pequeñas se ha observado un aumento del calcio intracelular utilizando ATP, el que actuaría vía receptores P2Y mediado por IP<sub>3</sub>, produciendo vasoconstricción [Henríquez et al. 2018].

Particularmente en HAP existen dos grandes líneas que se refieren a la posible participación de la señalización purinérgica en su patogenia. La primera de ellas es que existiría en los pacientes con HAP una sobreexpresión de los receptores P2Y y no así en otros tipos de HP, como aquella secundaria a fibrosis pulmonar, lo que fue descrito en análisis de *microarrays* de todo el genoma de muestras de tejido pulmonar de pacientes con HAP [Rajkumar et al. 2010]. Esto se complementa con estudios hechos en el laboratorio que demuestran que en el modelo de rata de HAP inducido por MCT, existe también un aumento de los receptores P2Y, específicamente P2Y<sub>1</sub> P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> [Villaroel, 2017].

La segunda línea de evidencia relaciona la mayor disponibilidad de nucleótidos a nivel de la circulación pulmonar en pacientes con HAP. Estudios han demostrado la elevación en los niveles de nucleótidos en ciertas enfermedades pulmonares [Lazarowski et al., 2003]. Asimismo, se ha descrito que los pacientes con HAP presentan una disminución de las ectonucleotidasas vasculares, así lo reportó Helenius y cols. utilizando imágenes de inmunohistoquímica de la ectonucleotidasa CD39, sugiriendo que existiría una acumulación de ATP en el nicho extracelular pulmonar de estos pacientes [Helenius et al. 2015]. Siguiendo esta línea, el artículo de Visovatti y cols, detalla las posibles relaciones que existirían entre una disregulación en la señalización purinérgica y la HAP. Estos investigadores hipotetizaron que

la enzima ectonucleotidasa CD39, que resulta ser una de las principales responsables de las concentraciones extracelular de nucleótidos a nivel vascular, podría producir un desbalance entre los nucleótidos extracelulares causado por la expresión anómala de esta enzima, jugando un rol en la fisiopatología de la HAP. Así, utilizando un modelo murino con delección del gen que codificaba para CD39, identificaron un aumento marcado de ATP y expresión del receptor P2X1 en los animales con HAP, lo cual en condiciones de hipoxia producía un aumento de presión de arteria pulmonar. Lo anterior fue reafirmado al hallar esta misma disminución de CD39 y aumento del receptor en muestras de vasos pulmonares de pacientes con HAP [Visovatti et al., 2016].

#### IV. SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN OTROS SISTEMAS

La señalización purinérgica también está implicada en otros sistemas, por ejemplo, en el músculo esquelético los receptores purinérgicos presentan un rol fundamental ya que son responsables de la traducción de señales de nucleótidos extracelulares. En este sistema, la célula muscular libera ATP en respuesta a la contracción a través receptores de panexina, lo que genera la activación de receptores P2X y P2Y para la inducción de señales rápidas y lentas de calcio. Siendo generadas en mayor medida estas últimas, las cuales modularán la expresión génica, afectando entre otras cosas, la plasticidad muscular [Casas et al. 2014, Casas et al. 2010]. Asimismo, a nivel renal regulan la apertura y tráfico a través de canales de agua y iones en los túbulos renales, principalmente en los segmentos distal y colector. Su activación cuando se encuentran en el epitelio vascular, induce vasoconstricción particularmente en la arteriola aferente, regulando la perfusión glomerular [Wildman et al. 2008]. Por otro lado, a nivel hepático destaca que la circulación purinérgica está implicada en regular la presión de arteria hepática [Vaughn et al.2014]. Finalmente, a nivel cardiaco los receptores purinérgicos están involucrados en múltiples procesos: Están presentes en la inervación simpática a nivel cardiaco, además las purinas han sido identificadas como potentes dilatadores de las arterias coronarias y específicamente el ATP produce una marcada contracción en las venas coronarias epicárdicas, de modo que este nucleótido controla el flujo sanguíneo durante el ejercicio [Burnstock 2017].

## V. CONTRIBUCIÓN DEL SISTEMA VENOSO A LA RESISTENCIA VASCULAR PULMONAR

Comúnmente se ha considerado al sistema venoso pulmonar como vasos que ejercían una función únicamente de conducción, pero hoy se sabe que tienen otras funciones siendo capaces de regular la presión de filtración a través de vasoconstricción. Los cambios en el tono venoso producen efectos a nivel del reclutamiento y distensión de los vasos alveolares río abajo. De este modo, las venas pulmonares contribuyen a la resistencia vascular pulmonar (RVP) a través de una vasoconstricción activa, presentando reactividad a diferentes estímulos [Gao et al. 2005].

El aumento de la presión en las venas pulmonares se conoce como hipertensión venosa pulmonar (HVP) y en los pacientes que la presentan aumentan la PAPm por la transmisión pasiva en forma retrograda [Kulik et al. 2014]. La HVP puede producir un incremento en la RVP, ya que este aumento de la presión intravascular produce un aumento del estrés en la pared de la arteria, con lo cual se genera un aumento en la tensión de las células musculares lisas activando mecanorreceptores y gatillando una vasoconstricción, que lleva a un aumento de la RVP. En el largo plazo, este aumento de la RVP podría inducir una remodelación con hipertrofia de la capa media e hiperplasia de la íntima [Kulik et al. 2014 y Gao et al. 2005], lo que ha sido observado en un 50% de los pacientes con HAP en venas pequeñas (<250  $\mu$ M) [Gao et al. 2005].

En razón de lo anterior, estudiar los efectos en la contractibilidad vascular pulmonar ligada a la vía de señalización purinérgica en las venas intrapulmonares pequeñas resulta interesante y podría contribuir al estudio de la etiopatogenia de la HAP.

## VI. MODELO EXPERIMENTAL DE HAP INDUCIDA POR MONOCROTALINA

Para estudiar experimentalmente la HAP es necesario utilizar un modelo animal que simule lo que ocurre también en humanos. Dentro de los modelos experimentales para ello, destaca el inducido por monocrotalina (MCT), que ya se conocía en 1967 cuando se reportó que la ingestión de *Crotalaria spectabilis* en ratas jóvenes producía hipertensión pulmonar [Kay et al. 1967].

Se desconoce el mecanismo exacto por medio del cual la MCT induce el cuadro de HAP, el cual se caracteriza por hipertrofia de las células del músculo liso de la media en las arterias pulmonares, con mayor proliferación y resistencia a la apoptosis [Gómez-Arroyo et al., 2011; Maarman et al., 2013], generando un aumento en la RVP, lo que lleva a una sobrecarga en el ventrículo derecho y su consecuente hipertrofia y posterior falla. Este modelo no solo lesiona



las arterias pulmonares, sino que también es capaz de inducir edema alveolar, hiperplasia celular septal alveolar y oclusión de venas pulmonares [Gómez- Arroyo et al. 2011].

El modelo con MCT presenta relevancia en la investigación preclínica particularmente de la HAP (tipo 1), ya que no reproduciría las características de otros tipos de HP, como el tipo 2 o 3 siendo un modelo aceptado para el estudio de ésta [Das et al. 2012; Ryan et al. 2011].

La MCT, ya a partir del día 14 post inyección produce una caída significativa en el tiempo de aceleración de la arteria pulmonar, cuantificado por ecocardiografía y que se relaciona directamente con un aumento de la PAPm [Arellano, 2016]. Las dosis que hoy se usan regularmente son de 60-80 mg/kg a través de una inyección única subcutánea [Maarman et al. 2014], siendo la más utilizada la de 60 mg/kg., ya que dicha dosis presenta selectividad por el territorio vascular pulmonar y no produce alteración en los vasos sistémicos ni en las vías aéreas como otros modelos [Ryan et al. 2011].

## VII. SURAMINA

Corresponde a una droga aprobada por la FDA. Fue desarrollada en el 1920 como tratamiento para la tripanosomiasis y oncocercosis. Es un inhibidor no selectivo de los receptores P2 [Dunn 1988] y un fuerte inhibidor de factores de crecimiento PDGF, FGF<sub>2</sub> y EG [Xiog et al., 2014], en particular sobre las células del músculo liso de arteria pulmonar [Izikki et al., 2013]. Lo anterior ha determinado que en estudios clínicos han mostrado que la suramina es un fuerte agente anticancerígeno y también se ha utilizado en el tratamiento contra enterovirus en pediatría [Ren et al., 2014].

La evidencia disponible sugiere fuertemente que el tratamiento con suramina en el modelo de MCT-HAP produce efectos benéficos, en particular el estudio de Izikki y cols. muestra que esta tiene un fuerte efecto inhibitorio en las células musculares lisas de las arterias pulmonares por medio del bloqueo de los receptores de tirosinas kinasas, lo cual fue observado tanto en el modelo experimental como en las células humanas *ex vivo*, siendo este efecto significativo cuando se comparaba con los efectos del masitinib. El tratamiento con suramina en estas ratas revertió el desarrollo de HAP, mejorando la supervivencia, disminuyendo la PAP así como también reduciendo la hipertrofia ventricular derecha y la remodelación vascular en comparación con los controles [Izikki et al., 2013].

## VIII. CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

La **capacidad cardiorrespiratoria** se define como la capacidad del sistema circulatorio y respiratorio para entregar el oxígeno necesario durante la actividad física y de eliminar productos de la fatiga cuando el sistema genera desechos metabólicos. Esta capacidad cardiorrespiratoria nos permite realizar actividad física y ejercicio con determinado desempeño. **La actividad física** se define como cualquier movimiento corporal producido por el sistema neuro-músculo esquelético que determinen un gasto de energía. A diferencia de lo anterior, **el ejercicio** es un subtipo de actividad física que es planeada, estructurada, repetitiva y propositiva, en aras de mantener o mejorar uno o más componentes de la aptitud física [Caspersen et al., 1985].

De este modo, los test de ejercicios son comúnmente utilizados para evaluar la capacidad cardiorrespiratoria de un individuo, siendo la medición del consumo  $VO_2\text{max}$  la más utilizada y que determina el límite superior de ésta [Bassett et al., 1999, Caspersen et al., 1985]. El  **$VO_2\text{max}$**  se define como la tasa más alta a la cual el oxígeno puede ser captado y utilizado por el organismo durante un ejercicio intenso. El  $VO_2\text{max}$  depende de: (1) flujo sanguíneo, que depende a su vez del gasto cardíaco (GC), (2) del contenido arterial de oxígeno y (3) del contenido venoso de oxígeno. En un test incremental, al aumentar la carga de trabajo (o la velocidad de la carrera), el  $VO_2\text{max}$  aumenta, pero no en forma indefinida sino hasta alcanzar un *plateau* [Bassett et al., 1999, Pescatello et al., 2014]. Este *plateau* es raramente alcanzado en pacientes con patologías respiratorias, de modo que el concepto de  $VO_2\text{peak}$  es usualmente utilizado [Pescatello et al., 2014].

Cuando la medición directa del  $VO_2\text{max}$  no es posible, se pueden utilizar una variedad de test máximos y sub-máximos para estimar el  $VO_2\text{max}$  a partir de la correlación entre éste y respuestas fisiológicas conocidas (como la frecuencia cardíaca) o a partir de la correlación del  $VO_2\text{max}$  con las variables de desempeño del test (por ejemplo, carga de trabajo) [Pescatello et al., 2014]. En particular el  $VO_2\text{max}$  se correlaciona en forma lineal con la velocidad de la carrera del test de ejercicio y con la carga de trabajo [Billat 2002] lo cual no ocurre con otras variables como el umbral del lactato, el cual aumenta en forma exponencial al aumentar la carga en humanos [Shepard et al., 1968]. La velocidad de carrera máxima asociada al  $VO_2\text{max}$  se conoce como velocidad aeróbica máxima (VAM) [Billat 2002 y Berthon et al. 2002].

Los pacientes con HAP tienen disminuida su capacidad cardiorrespiratoria y tolerancia al esfuerzo físico en etapas tempranas de la enfermedad [Miyamoto et al., 2000], con una disminución en el  $VO_2\text{max}$  [D' Alonso et al., 1987]. Las razones de esto se encuentran ligadas al desequilibrio entre vasoconstrictores y vasodilatadores del sistema vascular pulmonar. Durante el ejercicio hay un aumento del GC el cual se transmite íntegramente al sistema pulmonar, lo que gracias a mecanismos compensatorios logra mantener la RVP en sujetos sanos. Lo anterior se produce gracias a la liberación de vasodilatadores [Naeije et al., 2012] y esto estaría disminuido en los pacientes con HAP. A su vez, la liberación de vasodilatadores estaría mediada en parte por la respuesta del endotelio a los cambios del *shear stress*, existiendo evidencia que sugiere que los pacientes con HAP tienen menor capacidad de reaccionar a dichos cambios en el *shear stress* [Szulcek et al., 2016].

Lo anterior sustenta el hecho que algunos medicamentos como la terapia con análogos de PC, antagonistas de los receptores de endotelinas e inhibidores de la PD-5 produzcan mejoras en el test de marcha 6 minutos [Demir et al., 2015].

En conjunto, los antecedentes presentados en relación a la HAP y el rol de la regulación purinérgica, respecto a que éstos se encuentran aumentados en los pacientes con HAP y que existe aumento de biodisponibilidad de nucleótidos a nivel vascular sería responsable de una respuesta hipercontráctil de los vasos intrapulmonares en estos pacientes, lo cual nos permite sustentar la hipótesis que involucra que la inhibición de esta vía podría producir una mejora de la capacidad cardiorrespiratoria.

## **HIPÓTESIS**

El tratamiento con suramina mejora la capacidad cardiorrespiratoria y la sobrevida de ratas con HAP debido en parte a una disminución de la respuesta contráctil venosa a ATP.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

Determinar los efectos del tratamiento antipurinérgico (suramina) en grupo de ratas con HAP a nivel clínico (sobrevida y CC) y a nivel fisiológico (hipertrofia cardiaca derecha y contractibilidad).

Objetivos específicos:

1. Determinar y comparar capacidad cardiorrespiratoria ratas control (C), control con suramina (C+S), HAP e HAP con suramina (HAP +S).
2. Describir y comparar características del peso a lo largo del estudio del grupo de ratas control, control con suramina, HAP e HAP con suramina.
3. Realizar y comparar curvas de sobrevida de ratas control, control con suramina, HAP e HAP con suramina.
4. Determinar y comparar la hipertrofia cardiaca derecha en ratas control, control con suramina, HAP e HAP con suramina.
5. Determinar y comparar el  $EC_{50}$  de ATP en venas intrapulmonares pequeñas mediante construcción de curva dosis-respuesta a ATP en ratas control, control con suramina, HAP y HAP con suramina.

## MÉTODOS

Este proyecto contó con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile con número de protocolo CBA 0928 año 2017.

### Tipo de estudio

Este proyecto correspondió a un estudio de tipo prospectivo, longitudinal y experimental.

#### *I. Animales*

Se utilizaron 28 ratas sexo masculino, especie *rattus norvegicus* cepa Sprague - Dawley de edad mayor de 42-45 días con pesos iniciales entre 200-250 grs. Que fueron divididas en 4 grupos:

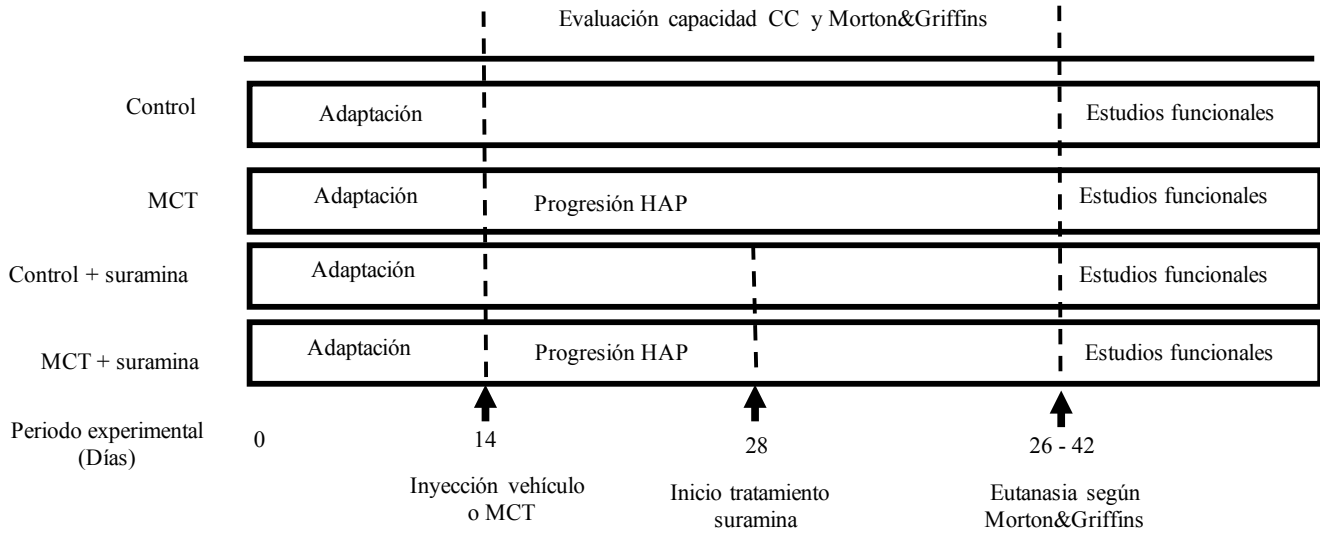
1. Grupo control sin tratamiento (n=4)
2. Grupo control con suramina (n=8)
3. Grupo con HAP inducida por MCT sin tratamiento (n=8)
4. Grupo con HAP inducida por MCT con tratamiento con suramina (n=8)

Los datos de las ratas control sin suramina fueron obtenidos desde datos anteriores realizados en el laboratorio y unidad de investigación previa a la tesis.

#### *II. Procedimiento*

Para inducir HAP se utilizó una dosis 60 mg/kg de MCT que fue administrada por medio de una inyección única por vía subcutánea el día 14 de iniciado el estudio, el grupo control recibió una inyección de vehículo sin MCT en la misma dosis y vía. El tratamiento con suramina fue de 10 mg/kg por vía intravenosa 2 veces por semana a partir del día 28 del inicio del estudio.

Se evaluó dos veces por semana la capacidad cardiorrespiratoria según se detalla más adelante y la escala de sufrimiento animal. Finalmente, al cumplir con los criterios para la eutanasia del animal o cumplir con el periodo de estudio se realizó este procedimiento para continuar con los estudios funcionales en pulmón y análisis de hipertrofia cardíaca.



Esquema explicativo procedimientos. HAP: Hipertensión arterial pulmonar; MCT: monocrotalina

#### A. TEST DE CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA

Se utilizó un *treadmill* de marcha marca Masterfit ®, adaptado para ratas con dos cajas de acrílico de dimensiones 53 x 10 x 15 cm, al igual que el dispositivo PanLab Harvard Aparatus ®, con una rejilla metálica que le permitía al animal dejar de correr si era necesario y un adaptador para dispensar aire comprimido y estimular al animal a seguir corriendo. Los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación de 2 semanas en el cual, 3 veces por semana, las ratas debían caminar durante 10 minutos sobre el *treadmill* a una velocidad constante de 10 m/min, cuando la rata pisaba la rejilla posterior del *treadmill* con las patas traseras le era aplicado un *puff* de aire comprimido para estimular a que la rata continuara corriendo.

El test de evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria consistió en un test escalonado a 0° de inclinación que comenzaba a 10 m/min y en el que se aumentaba la velocidad en 1,67 m/min cada dos minutos hasta que la rata alcanzaba la fatiga, definida como el momento en que la rata a pesar de 3 estímulos de aire comprimido no continuaba corriendo o permanecía 5 segundos en la rejilla posterior del *treadmill*. La velocidad aeróbica máxima fue definida como la velocidad alcanzada el último nivel donde el animal completaba un minuto.

Para la realización de estas pruebas se utilizaron las recomendaciones según la literatura, según las cuales, las ratas fueron trasladadas desde el bioterio en cajas y dejadas en el laboratorio en

la zona donde se encuentra el treadmill, donde permanecieron entre 45 minutos y 1 hora previos a la evaluación. Se pesaba al animal y luego se colocaba en el *treadmill* al interior de la caja de acrílico. Se le permitía explorar 5 minutos previos al inicio de la prueba, luego de lo cual se comenzaba a 10 m/min y se aumentaba la velocidad según lo detallado anteriormente. Cuando se cumplían los criterios de fatiga, se procedía detener el *treadmill* y se le permitía al animal descansar nuevamente 5 minutos antes de ser devuelto a su caja. Entre cada evaluación se eliminaban las heces y la orina que pudieran haber quedado en el treadmill y al finalizar todas las evaluaciones se limpiaba con alcohol al 75%.

#### B. ESCALA DE MORTON & GRIFFITHS

Según las recomendaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se utilizó para estos procedimientos experimentales la escala de supervisión de animales de Morton y Griffiths, la cual permite cuantificar el dolor y aflicción de los animales causados por determinados procedimientos, de modo de tomar las medidas apropiadas y aliviarlos. Este protocolo considera 5 características (pérdida de peso, aspecto, comportamiento espontáneo, comportamiento frente la manipulación y constantes vitales). A cada animal se le asignó una puntuación por cada una de estas variables, las cuales fueron evaluadas semanalmente por personal capacitado. De acuerdo a puntuación total, se determinaba el momento en que se realizaba la eutanasia.

#### C. EUTANASIA

Una vez que las ratas cumplían los criterios para la eutanasia, que según lo reportado en la literatura sería aproximadamente a la 4<sup>a</sup> semana luego de la inyección con MCT, éstas fueron eutanasiadas a través de una inyección intraperitoneal de 3 a 5 veces la dosis anestésica normal de una solución de ketamina 180mg/kg y xilazina 18 mg/kg con el fin de generar una narcosis previa al método físico de eutanasia que correspondió a la apertura torácica bajo anestesia profunda. Los animales fueron mantenidos durante todas las semanas en el bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile siendo trasladados para los diferentes procedimientos al laboratorio de Dinámicas broncovasculares y daño pulmonar, ubicado en el segundo piso del diente G.

#### D. REBANAS DE PULMÓN CORTE PRECISO (PCLS) E ÍNDICE DE FULTON

Posterior a la inyección de anestésico y luego de haber realizado la apertura torácica, se canuló la tráquea para inyectar a través de ella una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (dosis 4,5 mg/100 gr) que nos permitió inflar el pulmón hasta capacidad pulmonar total. Además, se inyectó a través del ápex del ventrículo derecho 5 ml de gelatina para mantener abierto el lumen de los vasos pulmonares. Posterior a las inyecciones, se mantuvo el cadáver por 45 minutos a una temperatura de 4°C para permitir la solidificación de ambas soluciones, luego de lo cual se extrayeron los pulmones y el corazón de la rata. Se utilizó para los estudios funcionales rebanadas de pulmón provenientes del tercio inferior del pulmón izquierdo. El trozo pulmonar se montó en un vibratomo (Compresstome VF-300) que generó rebanas de un grosor de 150  $\mu\text{m}$ , las cuales fueron mantenidas en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; contiene glucosa, L - glutamina, bicarbonato de sodio) en un ambiente a 37°C y con 5% de  $\text{CO}_2$  por 12-20 horas hasta que se realizaron los estudios de vaso-reactividad. Del corazón de la rata se extrajo y separó el ventrículo derecho, septum y ventrículo izquierdo para luego ser pesado y calcular el índice de Fulton, que se calcula tomando el peso del ventrículo derecho dividido por el peso del ventrículo izquierdo más el septum cardiaco.

#### E. ESTUDIOS DE VASO-REACTIVIDAD EN VENAS PEQUEÑAS

Se obtuvo las curva dosis - respuesta para ATP en venas intrapulmonares pequeñas de un tamaño menor de 200  $\mu\text{m}$  bajo un microscopio invertido de contraste de fase modelo DXS-2 trinocular a 25X. Las concentraciones utilizadas para estimular el vaso y construir la curva fueron de 0,1 - 1000  $\mu\text{M}$  de ATP. Lo cual se realizó por medio de un sistema de microperfusión que perfundió durante 3 minutos con cada una de las diferentes soluciones mientras se registraba la vasoconstricción venosa por medio de un sistema de fotocaptura con el software S-Viewer. Este sistema obtuvo imágenes desde una cámara digital de alta resolución 0,45X modelo SXY -I30 DE 3.0 M pixeles con una frecuencia de 0,5 Hz. Adicionalmente se realizó en forma previa a la contracción con ATP una estimulación con  $\text{K}^+$  50 mM por 3 minutos, la cual nos permitió expresar luego los resultados en forma normalizada como porcentaje de la contracción inducida por el  $\text{K}^+$  y evaluar la funcionalidad de la vena. Posterior a esto la rebanada de pulmón era lavada por 10 minutos con solución salina Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) previo a la infusión con ATP a diferentes concentraciones.



### III. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el *software* GraphPad Prism 7.0. Los resultados están expresados en estadística no paramétrica, mostrando mediana y rangos. Para comparar los diferentes grupos se utilizaron pruebas no paramétricas para comparar muestras independientes, prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Además, para comparar datos de muestras relacionadas se utilizó el test de Wilcoxon y Test de Friedman. El análisis de supervivencia se realizó por medio de la construcción de la curva de Kaplan-Meier y la prueba de Mantel-Cox. Finalmente, para comparar las curvas de peso y las curvas dosis-respuesta se utilizó el F-Test. Se consideró una significancia estadística con un  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA

Se sometió a los animales a un proceso de adaptación de 2 semanas de duración, en el cual debían completar 10 minutos a una velocidad constante de 10 m/min en *treadmill*. En éste, si el animal no continuaba caminando era estimulado con un *puff* de aire comprimido. Las ratas que completaron exitosamente este periodo continuaron en el estudio se muestran en la tabla 1 y se les administró una inyección de vehículo o MCT según correspondiera el grupo de estudio control o HAP, respectivamente.

Los animales de cada grupo (C=4, C+S=6, HAP=7, HAP +S= 7) que completaron este proceso fueron sometidos a evaluaciones de la CC través de un test incremental en *treadmill*, según se describió en métodos. Estas evaluaciones fueron realizadas dos veces por semana. Aquellos animales que completaron exitosamente las etapas de las evaluaciones CC pueden verse en la tabla 2.

<b>Grupo</b>	<b>n inicial</b>	<b>Completaron adaptación</b>
<b>Control</b>	4	4
<b>Control con suramina</b>	8	6
<b>HAP</b>	8	7
<b>HAP con suramina</b>	8	7

Tabla 1: Ratas que completaron proceso adaptación según grupo de estudio

<b>Grupo</b>	<b>n inicial</b>	<b>Completaron evaluaciones</b>
<b>Control</b>	4	3
<b>Control con suramina</b>	6	4
<b>HAP</b>	7	6
<b>HAP con suramina</b>	7	5

Tabla 2: Ratas que completaron evaluaciones CC según grupo de estudio

En la figura 1 se observan las medianas de los valores obtenidos en el test cardiopulmonar en el primer día evaluación. La mediana para el grupo control fue 16,7 m/min (Rango 16,7-18,3 m/min), la del grupo control con suramina de 18,35 m/min (Rango 16,6- 23,3 m/min), para el grupo HAP de 20,8 m/min (Rango 15,0-25,0 m/min) y para el grupo HAP + S de 20,0 m/min (Rango 15,0-21,6 m/min). Al realizar un test estadístico para muestras independientes se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al inicio de las evaluaciones ( $p > 0,9$ ).

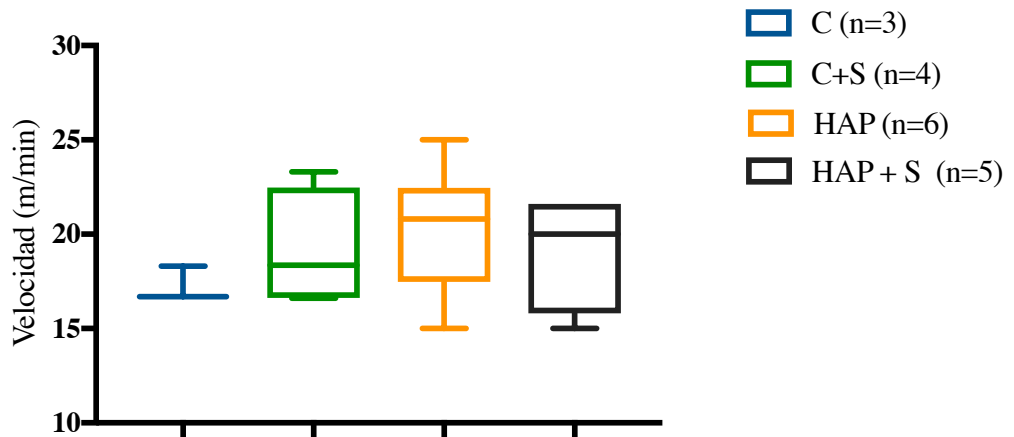


Figura 1. Velocidad aeróbica máxima inicial en ratas control (C), control son suramina (C+S), HAP y HAP con suramina (HAP+S). Pestañas de caja representan mínimo y máximo. Sin diferencia significativas, determinadas por Kruskal-Wallis \*  $p < 0,05$ .

Observamos en la figura 2, la progresión de la capacidad cardiorrespiratoria, reflejada por la velocidad aeróbica máxima, de las ratas de los grupos controles y controles con suramina expresado en forma relativa al valor inicial obtenido respectivamente (Anexo 1 se pueden observar los gráficos con los valores absolutos).

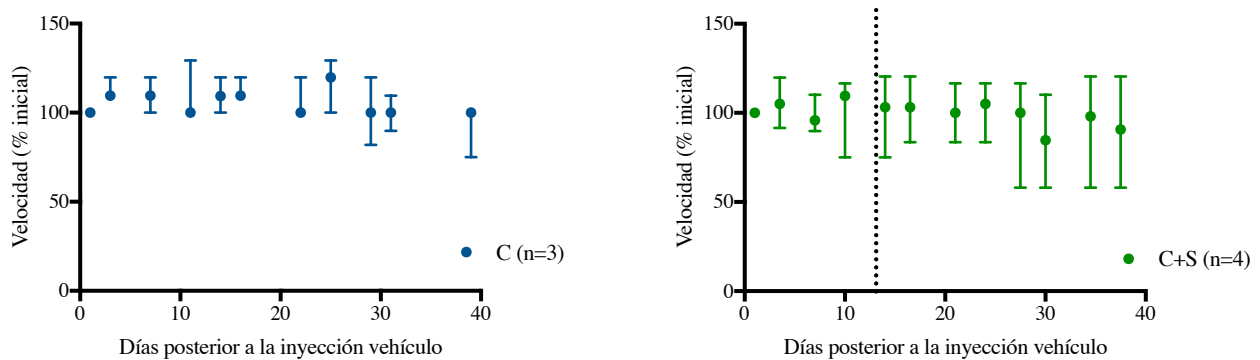


Figura 2. Porcentaje velocidad aeróbica máxima inicial en ratas controles (C) y ratas controles con suramina (C+S). Puntos representan mediana y pestaña rango, línea punteada indica inicio de tratamiento con suramina. No se encontraron diferencias entre días de evaluación determinada con test de Friedman, \*  $p < 0,05$

En las ratas controles (n=3) no se encontraron diferencias significativas entre los días de evaluación ( $p=0,18$ ), no existiendo variación de la velocidad aeróbica máxima en el grupo de ratas control a lo largo de las evaluaciones. El coeficiente de variación valor absoluto de velocidad aeróbica máxima fue de 5,66% intra-animal.

Asimismo, en el grupo de ratas control con suramina no se observaron diferencias significativas al lo largo de los días de evaluación( $p=0.32$ ), al igual que las ratas controles, con un coeficiente de variación de 7,41%.

En las siguiente figura, vemos la velocidad aeróbica máxima obtenida en las evaluaciones de las ratas HAP y HAP con suramina relativos a la velocidad aeróbica máxima inicial obtenida (Figura 3). Los valores absolutos se pueden observar en el anexo 1.

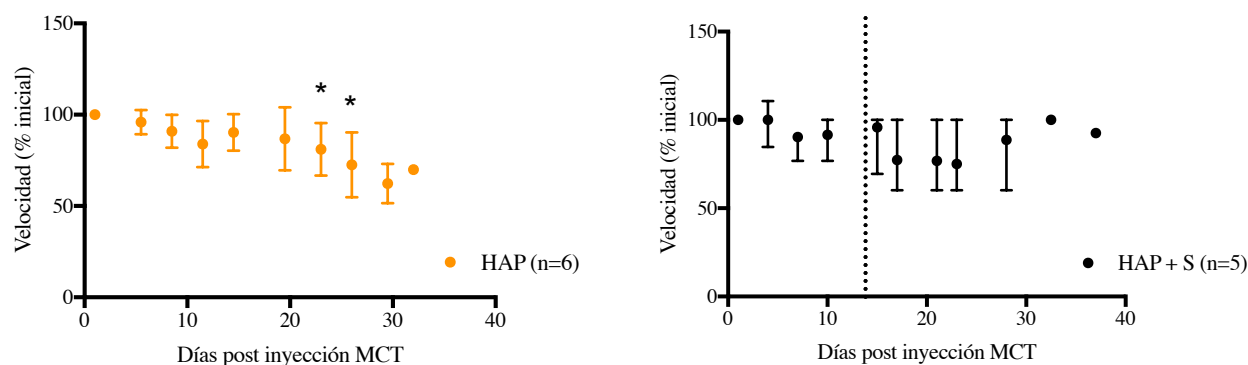


Figura 3. Porcentaje velocidad aeróbica máxima inicial en ratas hipertensas (HAP) y ratas hipertensas con suramina (HAP +S). Puntos representan mediana y pestaña rango, línea punteada indica inicio de tratamiento con suramina. Diferencias entre días de evaluación, determinada con test de Wilcoxon, \*  $p<0,05$ .

En el grupo de ratas con HAP se observa que desde el día 1, en el que se inyecta la MCT, la capacidad cardiorrespiratoria, reflejada a través de velocidad máxima obtenida, va disminuyendo, existiendo diferencias significativas desde el inicio de las evaluaciones con el día 23 y 28 posterior a la inyección de MCT ( $p= 0,016$  y  $p=0,031$ ).

Finalmente, al realizar el mismo análisis en las ratas HAP + S no se observa una disminución estadísticamente significativa a lo largo de los días de evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria como sí se observó en las ratas con HAP. Sin embargo, el coeficiente de variación presentado en las evaluaciones fue mayor al 10% de 10,51% . Debido a esto, se realizó

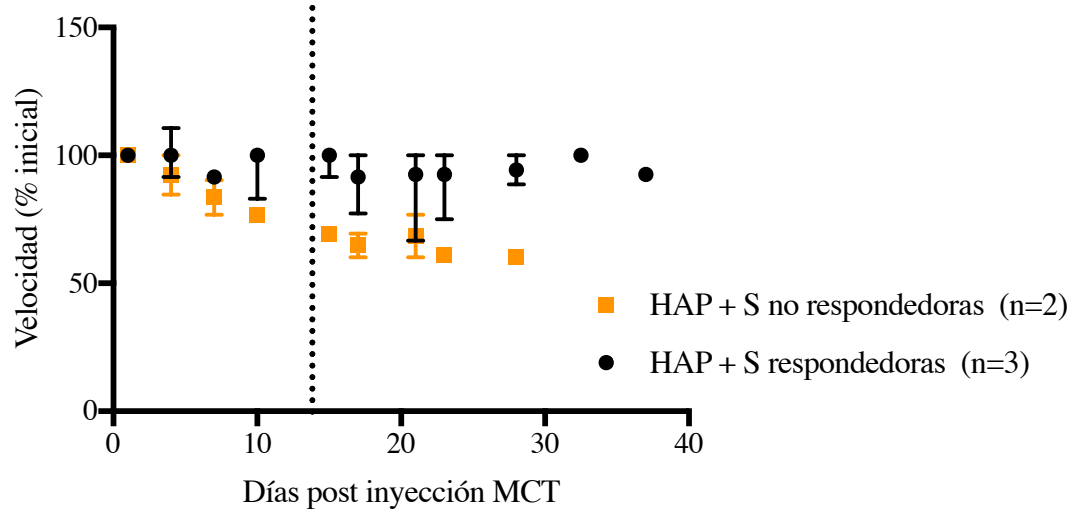


Figura 4. Porcentaje velocidad aeróbica inicial en ratas hipertensas con suramina (HAP +S) respondedoras y no respondedoras. Puntos representan mediana y pestaña rango, línea punteada indica inicio de tratamiento con suramina.

el análisis separado aquellos animales que por sus resultados mostraron respuesta a la suramina (n=3) y aquellos que se comportaron similares a las hipertensas (n=2) los cuales se muestran en la figura 4.

## 2. CURVAS DE PESO

A los animales mencionados en el apartado anterior se les realizó un seguimiento de la curva de peso desde el inicio de las evaluaciones cardiorespiratorias y procedimientos. En la figura 5A, vemos las curvas de aumento de peso de las ratas controles que realizaron nuestras evaluaciones cardiorespiratorias comparadas con un grupo de ratas del laboratorio que no realizaron estas

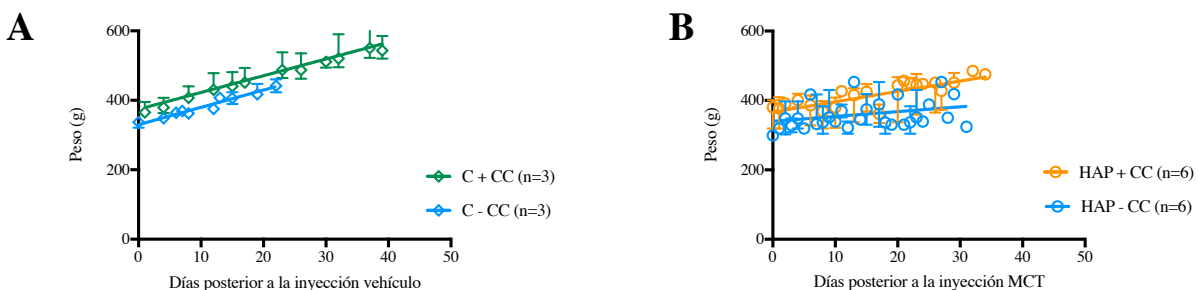


Figura 5. Comparación de curvas de peso en ratas control que realizaron (C+ CC) y no realizaron pruebas cardiorespiratorias (C -CC) y HAP que realizaron (HAP + CC) y no realizaron pruebas cardiorespiratorias (HAP - CC). Cada punto representa mediana  $\pm$  rango. Sin diferencia significativas evaluada por F-Test,  $p > 0,5$

evaluaciones. Asimismo, en la figura 5B, se observa la comparación de las curvas de pesos de ratas HAP que realizaron y no realizaron evaluaciones cardiotorrespiratorias.

Al comparar las pendientes de estas curvas como se observan en la tabla 3, no se observaron diferencias significativas entre éstas.

Grupo	Pendiente curva	F-Test
Control – CC	4,98 ± 0,37	p= 0,73
Control + CC	4,81 ± 0,21	
HAP - CC	1,39 ± 0,79	p= 0,1
HAP + CC	2,97 ± 0,46	

Tabla 3: Comparación pendientes curvas de peso en ratas control y ratas HAP que realizaron evaluaciones cardiotorrespiratorias (Control +CC y HAP + CC) con grupos control y HAP que no realizaron evaluaciones (Control – CC y HAP - CC).

En la figura 6, observamos en A la comparación de las curvas de peso de las ratas HAP que recibieron y no recibieron tratamiento con suramina y en B las ratas HAP con suramina versus controles con suramina.

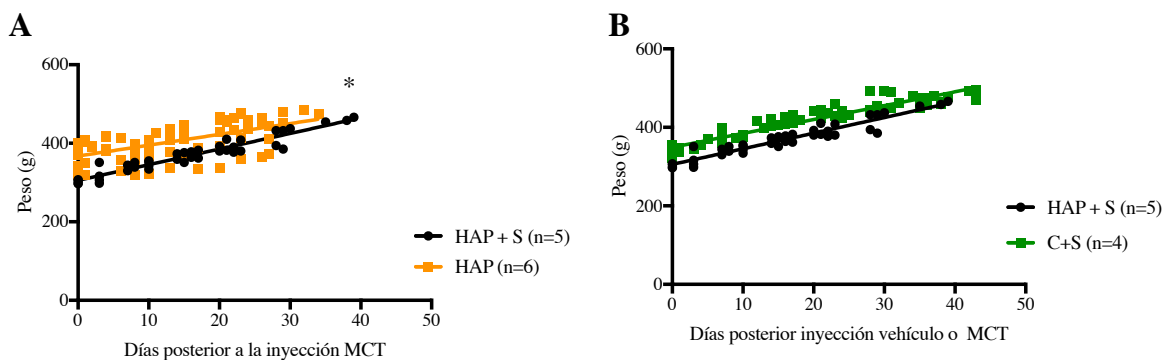


Figura 6. Comparación de curvas de peso de ratas HAP con ratas HAP con suramina (HAP+S) y ratas HAP con suramina (HAP+S) con ratas control con suramina (C+S). Cada punto representa un dato. Diferencia evaluada por F-Test, \* p<0,05

Al comparar las pendientes de las respectivas curvas como se muestra en la tabla 4, se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas HAP con y sin tratamiento, siendo mayor la pendiente de aumento de peso de las ratas que recibieron el tratamiento ( $p=0,041$ ). No se encontraron diferencias al comparar la pendiente de las ratas controles con suramina e hipertensas con suramina ( $p=0,086$ ).

<b>Grupo</b>	<b>Pendiente curva</b>	<b>F-Test</b>
<b>HAP + S</b>	$3,97 \pm 0,19$	$p= 0,086$
<b>C + S</b>	$3,53 \pm 0,14$	
<b>HAP + S</b>	$3,97 \pm 0,19$	$p=0,041$
<b>HAP</b>	$2,75 \pm 0,45$	

Tabla 4: Comparación pendientes curvas de peso ratas HAP con HAP con suramina (HAP+S) y HAP con suramina (HAP+S) con controles con suramina (C+S)

Finalmente, encontraron diferencias en la pendiente de la curva de peso de las ratas control con las ratas hipertensas, observando que la de éstas últimas era significativamente menor ( $p=0,003$ ).

### 3. CURVA SOBREVIDA

Considerando las intervenciones que se realizaron en estos animales, la primera que correspondía a la inducción de la HAP y luego las inyecciones de suramina, se realizó un análisis de sobrevida para los 4 grupos. Para el grupo control y el grupo control con suramina el 100% de los animales logró completar las 6 semanas posteriores a la inyección del vehículo con 8 inyecciones de suramina. La sobrevida del grupo HAP correspondió a 28 días mientras que en el grupo HAP con suramina la sobrevida aumentó a 36 días, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,017$ ), como se observa en la figura.

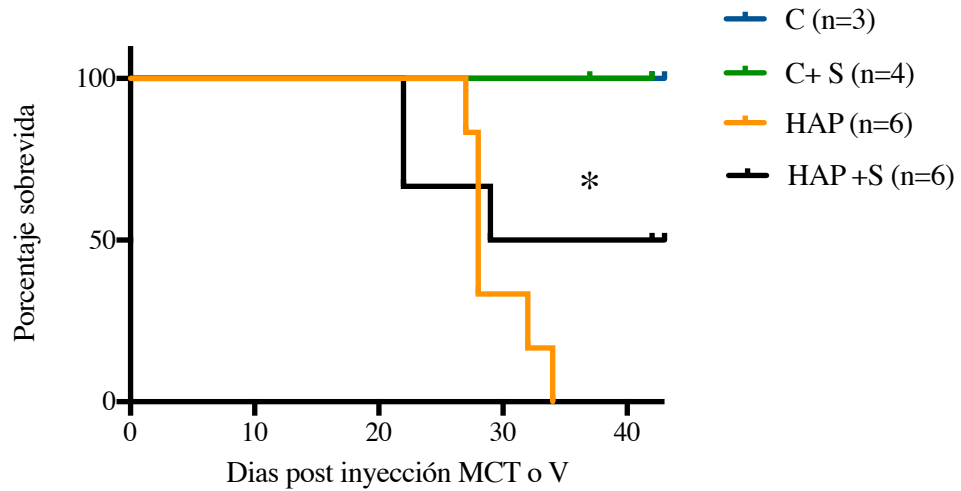


Figura 7. Curva Kaplan-Meier de ratas control (C), controles con suramina (C+S), con hipertensión (HAP) y HAP +S posteriores a la inyección de monocrotalina (MCT) o vehículo (V). Diferencias entre curvas evaluadas con Prueba de Mantel-Cox, \*  $p < 0,05$

#### 4. HIPERTROFIA CARDIACA DERECHA

Parte de los objetivos de esta tesis fue corroborar la efectividad del método con MCT para inducir HAP, esto fue realizado por medio de la evaluación de la hipertrofia cardiaca derecha a través del cálculo del índice de Fulton post-mortem, el cual, mediante la relación del peso del

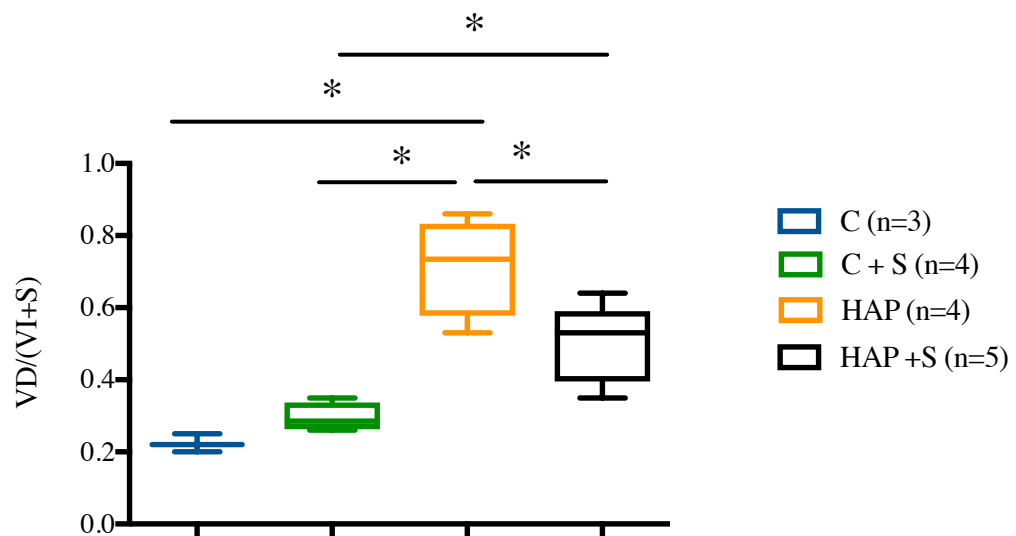


Figura 8. Comparación índice de Fulton ratas controles (C) y ratas controles con suramina (C+S), con hipertensión pulmonar (HAP) e hipertensión pulmonar con suramina (HAP +S). Diferencia evaluada Mann-Whitney \*  $p < 0,05$ .



ventrículo derecho con el peso del ventrículo izquierdo más el septum, logra identificar la presencia de hipertrofia del ventrículo derecho del corazón, como consecuencia de un aumento en la resistencia vascular pulmonar.

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>
<b>Control</b>	3	0,22	0,20 – 0,25
<b>Control con suramina</b>	4	0,28	0,26 – 0,35
<b>HAP</b>	4	0,73	0,53 – 0,86
<b>HAP con suramina</b>	5	0,53	0,35 – 0,64

Tabla 5: Mediana y rango de índice de Fulton grupo control, control con suramina, HAP y HAP con suramina.

En la figura 8 vemos graficados los índices de Fulton de los respectivos grupos y en la tabla 5 los respectivos valores.

Al comparar los valores de los respectivos grupos, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y control con suramina ( $p=0,06$ ). El índice de Fulton del grupo HAP resultó ser significativamente mayor al grupo control y control con suramina ( $p=0,02$ ), comprobando la efectividad del método de MCT para inducir HAP. El índice de Fulton del grupo HAP + S resultó ser significativamente mayor al del grupo control y control con suramina ( $p=0,03$  y  $p=0,02$  respectivamente) pero significativamente menor al del grupo HAP ( $p=0,03$ ). Al analizar por separado el peso del ventrículo derecho versus el peso del ventrículo izquierdo más el septum, vemos en la figura 9 que el peso del ventrículo derecho por si solo mantiene la relación que observamos en el índice de Fulton: sin diferencias entre el grupo control y control con suramina ( $p=0,62$ ), siendo significativamente mayor el del grupo HAP ( $p=0,01$ ) y el grupo HAP +S también significativamente mayor al grupo control y control con suramina ( $p=0,01$  y  $p=0,01$  respectivamente) pero menor al grupo HAP ( $p=0,03$ ). En la figura 10 vemos el peso del ventrículo izquierdo más el septum en los diferentes grupos. En este gráfico, destaca la diferencia significativa encontrada entre el grupo control con el grupo hipertenso, siendo menor el peso del ventrículo izquierdo más septum del grupo hipertenso ( $p=0,02$ ). También llama la

atención la diferencia encontrada entre el grupo control y control con suramina, siendo menor el grupo control con suramina ( $p=0,02$ ). Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre el grupo HAP y HAP con suramina ( $p=0,28$ ), ni entre el grupo HAP +S con el control con suramina ( $p=0,14$ ).

Al realizar el mismo análisis separando aquellos animales que respondieron y no respondieron al tratamiento no se observaron tendencias hacia diferencias entre estos dos sub-grupos.

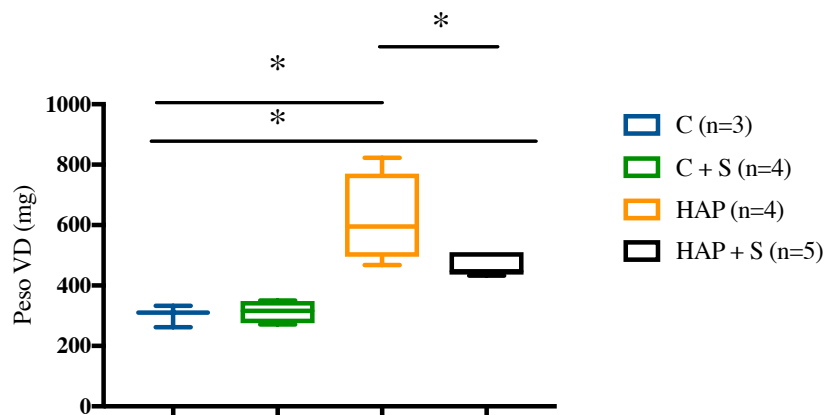


Figura 9. Comparación del peso del ventrículo derecho (VD) en ratas control, control con suramina, HAP y HAP con suramina. Diferencia evaluada por Mann-Whitnet,\*  $p<0,05$ .



Figura 10. Peso del ventrículo izquierdo y septum (VI+S) en ratas control, control con suramina, HAP y HAP con suramina. Diferencia evaluada por Mann-Whitnet,  $p<0,05$

## 5. CURVAS DE ATP Y EC<sub>50</sub>

Se realizaron experimentos de vasoconstricción para evaluar la respuesta a ATP de venas intrapulmonares pequeñas, en rebanadas de pulmón, obtenidas mediante la técnica de rebanadas de pulmón (PCLS). El efecto de ATP se evaluó mediante curvas dosis respuesta (0,1, 1, 10, 50, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de ATP) a dosis crecientes de ATP. La figura 11 muestra dos registros representativos de contracción de venas intrapulmonares pequeñas de ratas HAP y ratas HAP que recibieron suramina.

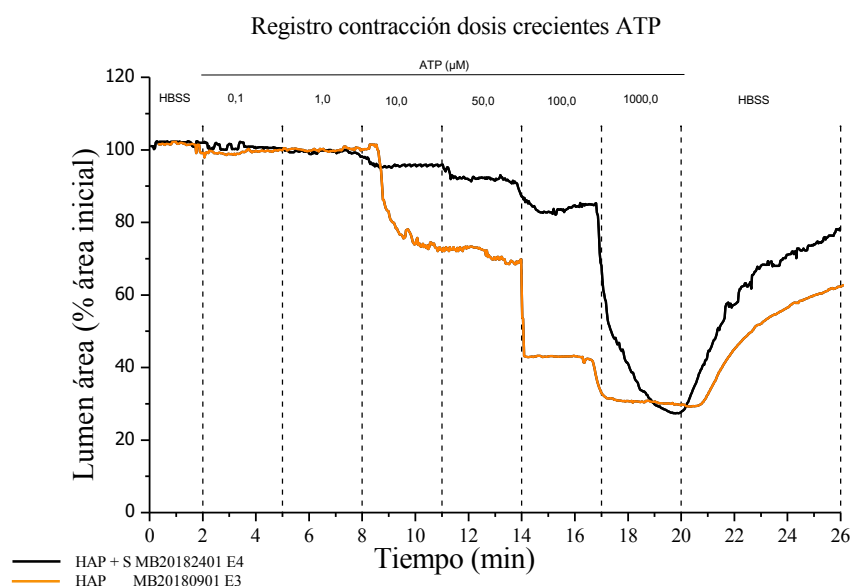


Figura 11. Registro representativo de contracción vena intrapulmonar pequeña en respuesta a dosis crecientes de ATP de ratas HAP (línea naranja) y ratas HAP con suramina (línea negra)

Al cuantificar las curvas de registro de los diferentes grupos se construyó una curva dosis respuesta para ATP (Figura 12), las cuales se ajustaron a un ajuste sigmoideo de Boltzmann.

Se observa que la curva de las ratas controles con suramina (curva negra), se encuentra prácticamente sobrepuesta con la curva de las ratas HAP con suramina y que la curva dosis respuesta de las ratas HAP sin tratamiento se encuentra desplazada a la izquierda de las dos anteriores. Señalar que en el grupo de ratas HAP con suramina donde se utilizaron 12 experimentos 7 de ellos venían de ratas que posteriormente fueron catalogadas como respondedoras provenientes de 3 animales (2, 3 y 2 experimentos respectivamente) y 5 de ellos

de ratas no respondedoras provenientes de 2 animales (1 y 4 respectivamente). Asimismo, las ratas HAP sin suramina se utilizaron 13 experimentos provenientes de 6 animales (2, 2, 4, 3, 1 y 1) respectivamente, las ratas Controles con suramina se utilizaron 12 experimentos que correspondían a 3 animales (3, 5 y 4) esto debido a que en un animal no se encontraron venas que cumplieran con los requisitos para ser utilizadas en las pruebas funcionales. Las ratas controles se utilizaron solo 5 experimentos de 3 animales (2, 1 y 2 respectivamente).

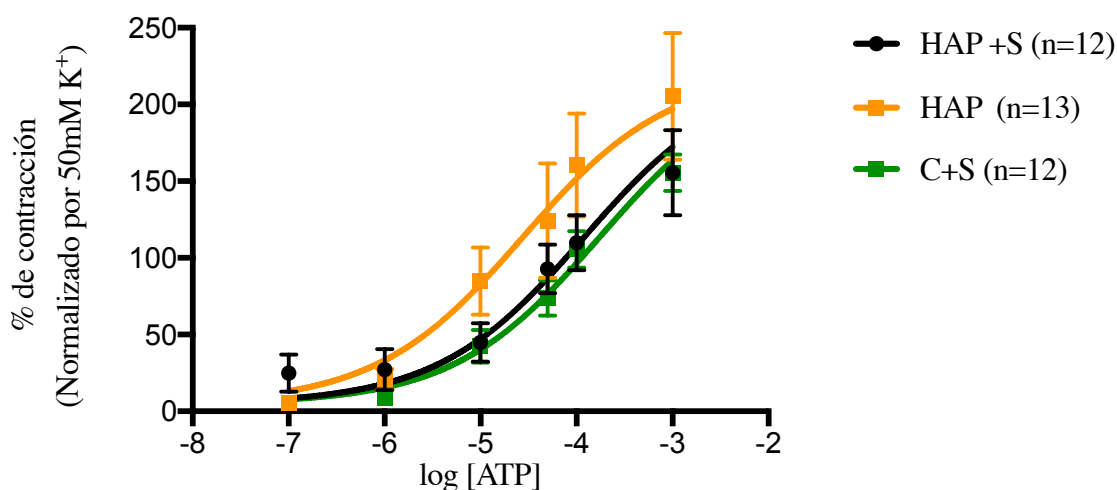


Figura 12. Curvas dosis respuesta a ATP ratas control con suramina (C+S), HAP y HAP con suramina (HAP +S). Cada punto representa media  $\pm$  S.E.M.

De los parámetros obtenidos del ajuste es posible obtener el valor de la concentración estimuladora al 50% ( $EC_{50}$ ), normalizado por la contracción máxima a 50mM de KCl, cómo se muestra en la tabla 6.

<b>Grupo</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>n</b>	<b>ANOVA</b>	
<b>Control</b>	51,6 ± 0,3 μM	5	p<0,001	
<b>Control con suramina</b>	72,4 ± 0,2μM	12		p<0,001
<b>HAP</b>	27,3 ± 0,5μM	13	p<0,001	
<b>HAP con suramina</b>	56,4 ± 0,2μM	12		

Tabla 6: Valores de EC<sub>50</sub> de ATP para los diferentes grupos.

Al comparar estos valores, existen diferencias entre el grupo control y control con suramina (p<0,001). Además, se observan diferencias entre estos dos grupos y el grupo HAP, siendo significativamente menor el EC<sub>50</sub> del grupo HAP (p<0,001). A su vez se encontraron diferencias entre el EC<sub>50</sub> del grupo HAP con suramina y los dos grupos controles (p<0,001) y entre el grupo HAP con suramina y HAP sin suramina siendo éste último significativamente mayor (p<0,001). Finalmente, al realizar un subanálisis del EC<sub>50</sub> a ATP separando aquellos animales HAP con suramina que respondieron y no respondieron al tratamiento, se observó una tendencia a presentar el sub-grupo respondedor un EC<sub>50</sub> mayor que aquellas que no respondieron a la suramina (69,2 μM con n=7 versus 31,3 μM con n=5), lo anterior solo demostró una tendencia debido al número pequeño de animales.

## DISCUSIÓN

### CAPACIDAD CARDIORRESPIRATORIA

Nuestros resultados muestran la factibilidad técnica de realizar pruebas de capacidad cardiorrespiratoria en forma efectiva y reproducible en ratas sanas y con patología, lo cual fue implementado por primera vez en nuestro laboratorio. A su vez, el test implementado en nuestro laboratorio, es capaz de evaluar la capacidad cardiorrespiratoria del animal en forma progresiva a lo largo de múltiples evaluaciones, presentando un coeficiente de variación bajo, tanto en los animales controles como aquellos controles con suramina (menor al 10%).

Los valores de velocidad aeróbica en el grupo control y control con suramina que fueron 16,7 m/min y 18,35 m/min respectivamente sin diferencias significativas entre ellos. Estos son menores a aquellos reportados en la literatura, donde se demostró que en valores entre 21m/min y 24 m/min se alcanza el *plateau* de su  $VO_2$ max [Hoydal et al.2007]. Las razones de éstas diferencias pueden ser múltiples:

1. Diferencias de alimentación y otras variables desconcertantes, como por ejemplo, composición proteica en el alimento u hora en que se realiza el experimento.
2. Diferencias en el método de estimulación que se utilizan para completar el test en el *treadmill*, considerando que el más frecuentemente utilizado el método de rejilla electrificada [Vignozzi et al., 2017] que resulta ser más irritante que el estímulo utilizado por nosotros, pero que es cuestionable cuando se utiliza con ratas enfermas donde el efecto de una descarga adrenérgica tan importante podría inducir falla cardiaca, razón por la cual decidimos un método lo más inocuo, pero estandarizarle, posible.
3. En este artículo, tuvieron la oportunidad de evaluar el  $VO_2$ max en forma directa a diferencia nuestra experiencia en donde evaluamos la velocidad, permitiendo así evaluar de forma precisa y quizás no precoz cuando el animal alcanzaba su VAM. Debido a lo anterior, es probable que nuestras mediciones correspondan más al  $VO_2$ peak y a la velocidad aeróbica peak que a los parámetros máximos.

Por otro lado, las ratas con HAP van disminuyendo su capacidad cardiorrespiratoria a medida que va evolucionando la enfermedad, es decir, desde la inyección con MCT. Esto queda reflejado en la diferencia estadísticamente significativa que se observa a partir del día 23 desde la inyección de MCT en la VAM obtenida en el test de ejercicio. Lo anterior es congruente con el hecho de que la HAP es una patología progresiva, y que esta característica está presente en el

modelo utilizado para estudiarla [Maarman et al. 2013]. Además, se condice con lo que ocurre en los pacientes con HAP, en los cuales existe una disminución de su capacidad cardiorrespiratoria desde etapas muy tempranas de la enfermedad [Miyamoto et al., 2000] y lógicamente también del  $VO_2\text{max}$  [D' Alonso et al., 1987].

El tratamiento con suramina de las ratas HAP permitió mantener la velocidad obtenida su capacidad cardiorrespiratoria reflejada por una mantención de la velocidad aeróbica *peak* a lo largo de las evaluaciones, lo cual resulta sumamente interesante a la hora de discutir respecto a los efectos que podría estar produciendo la suramina. Hipotetizamos que la suramina produce una disminución en la contractibilidad venosa de los animales con HAP, que determina una menor postcarga del ventrículo derecho lo que permitirá aumentar la precarga del ventrículo izquierdo y, por tanto, produce un aumento del gasto cardiaco y el consumo máximo de oxígeno, que lo observamos como un aumento de la VAM en comparación a las ratas HAP que no recibieron el tratamiento con suramina. Sin embargo, al realizar un sub análisis observamos que un 30% de los animales no respondieron a la suramina, al igual como ocurre con otros medicamentos, por ejemplo, se ha visto que solo aquellos pacientes con test de vasocontractibilidad positiva son capaces de responder a los bloqueadores de calcio [Zagolín et al., 2016] por lo que es necesario realizar investigación en esta área para determinar la razón de respuesta o no respuesta al tratamiento con suramina. Una de las razones evidentemente posibles para esto, resultar ser la dosis de suramina y que esta esté siendo insuficiente para lograr los efectos terapéuticos en algunos animales. Ya que en esta tesis se utilizó una dosis de suramina conocida de 10 mg/kg dos veces por semana que tenía reportado beneficios a nivel bioquímico e inmunológico [Izziki et al. 2013] pero en otros artículos donde se evalúa la capacidad de la suramina para inhibir fibrosis peritoneal se utilizan dosis de hasta 20 mg/kg siendo máximo el efecto a ésta dosis comparado con dosis más bajas [Xiong et al, 2014].

Asimismo, estos porcentajes de respondedores y no respondedores son similares a los reportados en la literatura, donde por ejemplo, a la hora de evaluar la mejora en el test de marcha 6 minutos con aumentos mayor al 20% posterior al tratamiento con sildenafil, un 57% de los pacientes resulto ser respondedor [Collard et al., 2007].

Por último, es importante mencionar que las evaluaciones podrían ser consideradas un entrenamiento para los animales, al ser en algunos grupos 12 “sesiones” en las que el animal debió ejercitarse a un porcentaje de su  $VO_2\text{max}$ . Al ser el escalón del test de 2 minutos de

duración, podríamos decir que en algunas ratas durante la mitad del tiempo total del test (4-6 minutos) estuvieron sobre su umbral ventilatorio 1 (VT1) y en el último escalón (2 minutos) sobre su umbral ventilatorio 2 (VT2), cumpliendo así con el principio de sobrecarga del entrenamiento y de especificidad del entrenamiento.

A pesar de ello, no creemos que estas evaluaciones puedan ser consideradas entrenamiento, en primer lugar, debido a que no cumplen con las recomendaciones del colegio americano de medicina deportiva, donde se detalla que, para un entrenamiento de resistencia cardiorrespiratoria la frecuencia recomendada es de 3 a 5 veces por semana. Además, al evaluar la duración de la sesión tampoco cumplen con los criterios, al ser necesario al menos 20 minutos de actividad física moderada, las guías hacen referencia a duraciones menores a 10 minutos, pero mencionan que podría ser considerada entrenamiento solo en poblaciones muy desacondicionadas y que es necesaria más investigación para determinar aquello [Pescatello et al., 2014]. De forma que no se cumple con el principio de periodicidad del entrenamiento. Asimismo, no existe progresión en donde se aumente el tiempo de la “sesión” ni aumento de la velocidad de la misma. Por último, esto se evidencia al observar que tanto las ratas controles como controles con suramina no presentaron mejoras en su desempeño a lo largo de los días.

#### CURVAS DE PESO

Las curvas de peso en ratas controles presentan similitud con aquellas entregadas por los distribuidores de los animales [Brower et al. 2015], alcanzando valores de peso acordes a los teóricos a las 12 semanas de vida. Las evaluaciones cardiorrespiratorias podrían haber inducido estrés y baja de peso, sin embargo, esto no ocurrió ya que al comparar estos animales con datos previos del laboratorio, observamos que no existen diferencias significativas entre los animales que realizaron y no realizaron las evaluaciones. Lo mismo se observó al comparar las ratas HAP que habían realizado y que no habían realizado evaluaciones cardiorrespiratorias. Lo anterior nos habla del éxito de las medidas que se tomaron para evitar el estrés en los animales, detalladas en los métodos.

Por otro lado, al comparar las pendientes de las ratas HAP con los controles (ambos grupos experimentales que realizaron las evaluaciones cardiorrespiratorias) observamos que las HAP tienen una pendiente significativamente menor, al igual como ocurre en algunos reportes en la literatura, influenciado por la disminución en el consumo de alimento y agua [Gillis et al. 1978].



Interesantemente, las ratas HAP tratadas con suramina presentan una pendiente de aumento de peso que es mayor que las ratas HAP, llegando a ser similar los animales controles con suramina. De modo que el tratamiento con suramina, permite normalizar la curva de crecimiento de los animales.

Tanto las ratas controles como aquellas que recibieron sólo suramina, alcanzaron una sobrevida del 100% al final de estudio, sobrellevando los procedimientos de evaluación cardiorrespiratoria e inyecciones de vehículo y suramina exitosamente. Las ratas con HAP presentan una sobrevida ligeramente más baja, que lo reportado en la literatura [Abe et al., 2004], donde la sobrevida fue de 30 días versus 28 días en nuestros animales. La disminución de la sobrevida en estos animales se debe a la naturaleza progresiva de la HAP. Las ratas HAP tratadas con suramina, presentaron una sobrevida significativamente mayor, alcanzando 36 días. Esta diferencia se explicaría debido a la inyección de suramina, la cual en parte según lo reportado en la literatura al ser un anti-factores de crecimiento, disminuiría la hipertrofia del ventrículo derecho [Izikki et al., 2013]. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que este estudio contribuye con otro elemento esencial en disminuir la sobrecarga del ventrículo derecho, lo cual es la disminución del tono venoso, reduciendo por tanto la hipertrofia del ventrículo derecho, siendo éste uno de los factores determinantes en la sobrevida [Ryan et al., 2014].

#### HIPERTROFIA CARDÍACA DERECHA

A través de nuestros resultados observamos que las ratas controles presentan índices de Fulton en los rangos de normalidad al igual que los disponibles en nuestro laboratorio [Arellano et al. 2016]. Además, las ratas control con suramina también presentan índices dentro del rango de normalidad, lo que es fundamental al comparar estos valores con los obtenidos en nuestras ratas con HAP, los cuales son significativamente mayores, lo que nos permite comprobar la inducción de HAP por MCT en forma *post mortem*.

Relevantemente, al comparar el índice de Fulton del grupo con HAP sin tratamiento y aquellas que recibieron suramina, las últimas presentan un índice de Fulton que es significativamente mayor al de las controles y controles con suramina, pero que es menor al de las ratas HAP sin tratamiento. Esto se condice a lo encontrado por otros investigadores en el mismo modelo de HAP-MCT [Izziki et al. 2013] y al hecho de que los receptores purinérgicos están relacionados

a procesos tróficos [Burnstock et al., 2017; Ravelic et al. 2015] reforzando nuestra conclusión respecto a que el aumento de la sobrevida en los animales tiene relación con la disminución de la hipertrofia del ventrículo derecho.

Es importante mencionar que, en casos donde existen diferencias del peso total del animal como se mencionó anteriormente, resulta útil para normalizar el peso de los órganos, el largo de la tibia, al ser este parámetro independiente del peso, lo cual se mantiene en el modelo de hipertensión pulmonar por MCT [Hardziyenka et al., 2011]. A pesar de que nosotros no contamos con el largo de la tibia para poder normalizar el peso del ventrículo derecho, observamos en este artículo que tanto el peso del ventrículo derecho por sí solo como éste normalizado por el largo de la tibia, fueron significativamente mayor en el grupo HAP [Hardziyenka et al., 2011].

Además, al comparar el peso total del corazón observamos que éste es significativamente menor en el grupo HAP y HAP con suramina lo que estaría respaldado debido a que la hipertrofia ventricular derecha contribuye a la pérdida de masa ventricular izquierda [Hardziyenka et al., 2011].

#### CURVAS DE ATP Y EC<sub>50</sub>

Finalmente, el ATP induce contracción de los vasos intrapulmonares de las ratas y particularmente en venas, como había sido ya mencionado por la literatura [Henríquez et al. 2018, Chootip et al. 2005].

El valor teórico EC<sub>50</sub> para ATP en la literatura es variable, por ejemplo, en arterias cerebrales se reporta un valor  $50,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$  [Malmsjö et al. 2002] y en el artículo de Sak et al. varía dependiendo la especie entre  $41,6 \pm 0,14 \mu\text{M}$  y  $0,17 \pm 0,1 \mu\text{M}$  [Sak et al. 2002].

Ahora bien, al comparar los EC<sub>50</sub> del grupo control y del grupo control con suramina, vemos que éste es mayor en el grupo que recibió suramina, lo cual ha sido reportado en la literatura en otro modelo [Dunn et al. 1988]. La razón de esto no está clara, no siendo posible atribuirlo a la permanencia de la suramina en el receptor purinérgico, esto ya que Dunn et al. concluye que la suramina ejerce un antagonismo de tipo reversible. Sí podría estar ocurriendo un proceso de desensibilización de los receptores, pero esto debería ser confirmado en otros estudios, en los que se analice la cantidad de receptores purinérgicos, distribución y funcionalidad. Otra razón posible, es debido a una menor cantidad de músculo liso, al estar la suramina bloqueando vía

purinérgica que ha sido implicada como parte de los estímulos que inducen trofismo del músculo liso vascular [Burnstock et al., 2017; Ravelic et al. 2015]. Lo anterior deberá ser confirmado con estudios posteriores.

Por otro lado, los  $EC_{50}$  de las ratas controles, con y sin suramina, son significativamente mayores que  $EC_{50}$  de las ratas HAP, lo cual está explicado por la sobreexpresión de estos receptores purinérgicos en la HAP que está reportada en la literatura [Rajkumar et al. 2010] así como también en el modelo HAP-MCT en datos de nuestro laboratorio [Villarreal, 2017]. La mayor disponibilidad de ATP debido a la menor cantidad de ectonucleotidasas no debería jugar un papel en este modelo experimental *ex vivo*, debido a que al tener un flujo de nucleótidos constante, la biodisponibilidad de ATP debería ser homogénea para todos los grupos.

El hecho que la suramina ayude a disminuir la contractibilidad venosa a ATP sin duda se puede relacionar con que las ratas HAP con suramina presenten una capacidad cardiorrespiratoria que no decae tan rápidamente en el tiempo como aquellas HAP sin tratamiento. Esto a su vez se relaciona con la disminución del índice de Fulton, ya que, al existir menos contractibilidad venosa, la sobrecarga del ventrículo derecho disminuye y por lo tanto la hipertrofia es menor. Ahora bien, al incorporar el hallazgo de los animales HAP con suramina que respondieron y no respondieron a ésta, es que se nos hace evidente una tendencia que relaciona a aquellas catalogadas como respondedoras con un  $EC_{50}$  que es mayor versus aquellas que se comportan como no respondedoras donde el  $EC_{50}$  pareciera ser menor a las controles.

Finalmente, podemos concluir que el tratamiento con suramina en el modelo de HAP-MCT, mejora la supervivencia y capacidad cardiorrespiratoria de los animales, en parte, debido a una disminución de contractibilidad venosa a ATP. Es necesaria más investigación para dilucidar a qué nivel estaría actuando la suramina en estos receptores.

#### EFFECTO DE LA SURAMINA A NIVEL MUSCULAR ESQUELÉTICO

Por ahora, no podemos descartar que exista un efecto a nivel del músculo esquelético que esté influenciando el desempeño en las pruebas cardiorrespiratorias. La evidencia disponible destaca que existiría una disfunción periférica en los pacientes con HAP y que esto también estaría presente en el modelo con MCT [Marra et al. 2015], lo cual podría estar contribuyendo a los peores resultados en las pruebas de capacidad cardiorrespiratoria observados en este grupo. Además, existe evidencia, tal como se mencionó en la introducción, que los receptores

purinérgicos están implicados en el proceso de plasticidad muscular, ya que a través de su activación se induce en gran medida la señal lenta de calcio que sería responsable de modificar la expresión génica que afectará, entre otras cosas, la plasticidad muscular. De modo que, al estar inyectado a los animales con suramina, sin duda podemos estar inhibiendo esta vía que induce plasticidad muscular [Casas et al., 2014]. Por lo que adicionalmente a los objetivos de esta tesis, se realizó una disección muscular esquelética de gastrocnemio-sóleo para estudios de histología en forma preliminar. Las fotografías se pueden observar en el anexo 2.

Esperamos realizar comparaciones histológicas: número de núcleos y fibras por campo y además evaluar el número de fibras por campo según tipo de fibra (I o II) en la tinción de succinil deshidrogenasa. Así éste será un control importante para descartar que los efectos descritos no se deben a cambios en la musculatura esquelética

## **CONCLUSIONES**

- 1.** Es posible evaluar la capacidad cardiorrespiratoria por medio de un test de ejercicio en población de ratas sanas y con HAP, en las cuales ésta va disminuyendo a lo largo de su enfermedad.
- 2.** El tratamiento con suramina dos veces por semana permite evitar en algunos animales con HAP la caída observada en la capacidad cardiorrespiratoria a lo largo de los días.
- 3.** A nivel funcional, el tratamiento dos veces por semana de suramina induce una disminución en la contractibilidad de venas intrapulmonares pequeñas en las ratas HAP, lo que podría estar produciendo que la capacidad cardiorrespiratoria se mantenga en el tiempo.
- 4.** Este tratamiento aumenta la sobrevida de los animales debido a una disminución de la hipertrofia cardíaca derecha.

A futuro será necesario repetir estos experimentos con un tamaño muestral mayor que permita hacer un análisis más detallado de las ratas que responden y que no responden a suramina y determinar las características mecanísticas que están produciendo el efecto observado, asimismo es necesario realizar estudios sobre la funcionalidad y expresión de los receptores purinérgicos en las ratas tratadas con suramina y eventualmente poder llevar estas hipótesis al ambiente clínico.

## LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones que encontramos a lo largo de este estudio se encuentran el n pequeño de animales con los cuales se pudo realizar las pruebas estadísticas, esto debido a una pérdida experimental más alta de lo esperado que determinó disminuir el n inicial de 8 animales por grupo hasta 5 en algunos grupos. Lo anterior, determinó que la potencia estadística calculada inicialmente en un 80%, disminuyera a un 60%. Además, debido a la naturaleza variable de la disponibilidad de venas intrapulmonares, no todos los animales cuentan con igual número de vasos donde se realizó las pruebas de contractibilidad, existiendo un sesgo en este punto que fue propio del n pequeño de los animales utilizados y del método experimental.

## REFERENCIAS

1. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, ... Takeshit A .(2004) Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circulation research*. 94(3): 385-393.
2. Arellano O. (2016) Papel de los receptores P2Y2 y/o P2Y4 en venas intrapulmonares pequeñas en un modelo de hipertensión arterial pulmonar. Tesis para optar al grado de magister en Fisiología, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Chile.
3. Ataya A, Cope J, Alnuaimat H. (2016) A review of targeted pulmonary arterial hypertension- specific pharmacotherapy. *J Clin Med*. 5(12): 114.
4. Barberà J, Román A, Gómez-Sánchez M, Blanco I, Otero R, López-Reyes R, ... Escribano P. (2018) Guía de diagnóstico y tratamiento de la hipertensión pulmonar: resumen de recomendaciones. *Archivos de Bronconeumología*.
5. Bassett D, Howley T. (2002) Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 32 (1): 70.
6. Bevacqua R, Bortman G, Perrone S. (2013) Antagonistas de los receptores de la endotelina para la hipertensión arterial pulmonar. *Insuficiencia cardíaca*. *Insuf card*. 8 (2); 77-94.
7. Berthon P, Fellmann N. (2002) General review of maximal aerobic velocity measurement at laboratory. *J Sports Med Phys Fitness*. 42: 257-66.
8. Billat LV, Koralsztein JP. (1996) Significance of the velocity at VO<sub>2</sub> max and time of exhaustion at this velocity. *Sports Med*. 22 (2): 90-108.
9. Brower M, Grace M, Kotz C, Koya V. (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Laboratory animal research*, 31(4), 166-173.
10. Burnstock G, Ralevic V. (2014). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev*. 66: 102 – 292.
11. Burnstock G. (2017) Purinergic signaling in the cardiovascular system. *Circulation research*. 120 (1): 207-228.

12. Caspersen C, Powell K, Christenson G. (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public health reports*. 100 (2): 126.
13. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E. (2014) ATP Signaling in Skeletal Muscle: From Fiber Plasticity to Regulation of Metabolism. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 42 (3): 110-116.
14. Casas M, Figueroa R, Jorquera G, Escobar M, Molgó J, Jaimovich E (2010) IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of general physiology*. 136(4), 455-467.
15. Collard H, Anstrom K, Schwarz M, Zisman, D. (2007) Sildenafil improves walk distance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 131(3), 897-899.
16. Chootip K, Gurney A, Kennedy C. (2005) Multiple P2Y receptors couple to calciumdependent, chloride channels in smooth muscle cells of the rat pulmonary artery. *Respir Res*. 6: 124.
17. D'Alonzo G, Gianotti L, Pohil R, Reagle R, DuRee S, Fuentes F, Dantzker D. (1987) Comparison of progressive exercise performance of normal subjects and patients with primary pulmonary hypertension. *Chest*. 92(1), 57-62.
18. Das M, Fessel J, Tang H, West J. (2012) A process-based review of mouse models of pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation*. 2(4), 415-433.
19. Demir R, Kūçūkođlu M. (2015) Six-minute walk test in pulmonary arterial hypertension. *Anatolian Journal of Cardiology*. 15 (3): 249.
20. Dunn P, Blakeley A. (1988) Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *British journal of pharmacology*. 93(2): 243-245.
21. Galiè N, Corris P, Frost A, Girgis R, Granton J, Jing Z, Rubin L. (2013) Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 62(25), D60-D72.
22. Galiè N, Humbert M, Vachiéry J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A,... Ghofrani A. (2015) ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 37(1):67–119.
23. Gall H, Felix J, Schneck F, Milger K, Sommer N, Voswinckel R, ... Grimminger F. (2017) The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: survival in pulmonary

- hypertension subgroups. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 36(9): 957-967.
24. Gao Y, Raj J. (2005) Role of veins in regulation of pulmonary circulation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 288(2): L213-L226.
  25. Gillis C, Huxtable R, Roth R. (1978) Effects of monocrotaline pretreatment of rats on removal of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline by perfused lung. *British journal of pharmacology*. 63(3), 435-443.
  26. Gómez- Arroyo J, Farkas L, Alhussaini A, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel N, Bogaard H. (2011) The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302: 363 – 369.
  27. Hardziyenka M, Campian M, Reesink H, Surie S, Bouma B, Groenink M, ... Tan H. (2011) Right ventricular failure following chronic pressure overload is associated with reduction in left ventricular mass: evidence for atrophic remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(8), 921-928.
  28. Helenius M, Vattulainen S, Orcholski M, Aho J, Komulainen A, Taimen P, ... & Alastalo T. (2015) Suppression of endothelial CD39/ENTPD1 is associated with pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 308(10), L1046-L1057.
  29. Henriquez M, Fonseca M, Perez-Zoghbi J. (2018) Purinergic receptor stimulation induces calcium oscillations and smooth muscle contraction in small pulmonary veins. *Journal of physiology*.
  30. Høydal M, Wisløff U, Kemi O, Ellingsen Ø. (2007) Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 14(6), 753-760.
  31. Izikki M, Mercier O, Lecerf F, Guin L, Hoang E, Dorfmüller P, ... Fadel E. (2013) The beneficial effect of suramin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *PloS one*. 8(10): e77073.
  32. Kay J, Harris P, Heath D. (1967) Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*. 22(2), 176-179.
  33. Kulik T. (2014) Pulmonary hypertension caused by pulmonary venous hypertension. *Pulmonary circulation*. 4 (4): 581-595.



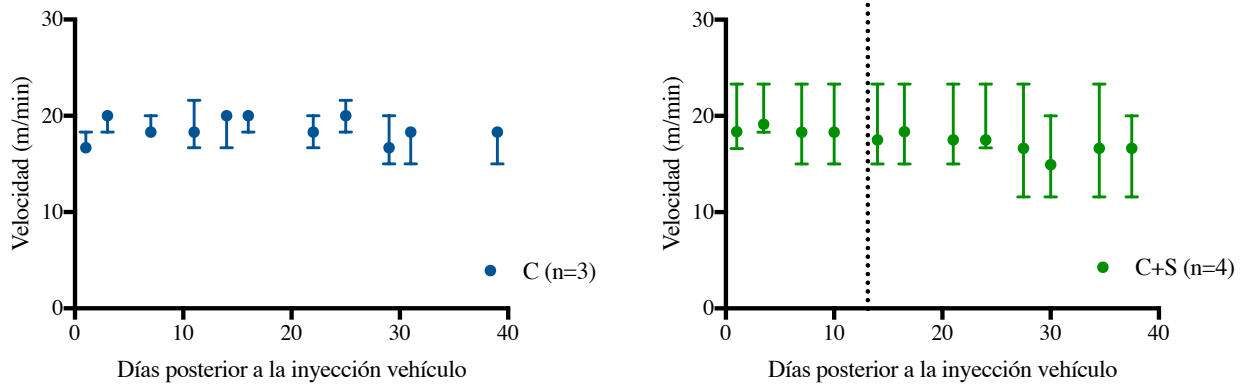
34. Lazarowski E, Boucher R, Harden K. (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 64: 785 – 795.
35. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K. (2013) A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet?. *Pulmonary circulation.* 3(4), 739-756.
36. Malmjö M, Hou M, Pendergast W, Erlinge, D, Edvinsson L. (2003) The stable pyrimidines UDP $\beta$ S and UTP $\gamma$ S discriminate between contractile cerebrovascular P2 receptors. *European journal of pharmacology* 458(3), 305-311.
37. Mitchell C, Syed N, Gurney A, Kennedy C. (2012) A Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride current pulmonary vasoconstriction. *Brit J Pharmacol.* 166: 1503 –1512.
38. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, ... Miyatake K. (2000) Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension: comparison with cardiopulmonary exercise testing. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 161(2), 487-492.
39. Naeije R, Chesler N. (2012) Pulmonary circulation at exercise. *Comprehensive physiology.*
40. Pescatello L. (2014) ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Philadelphia : Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
41. Rajkumar R, Konishi K, Richards T, Ishizawa D, Wiechert A, Kaminski N, Ahmad F. (2010) Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(4), H 1235-48.
42. Ralevic V, Dunn W. (2015) Purinergic transmission in blood vessels. *Autonomic Neuroscience.* 191: 48-66.
43. Ren P, Zou G, Bailly B, Xu S, Zeng M, Chen X, ... Buchy P. (2014) The approved pediatric drug suramin identified as a clinical candidate for the treatment of EV71 infection—suramin inhibits EV71 infection in vitro and in vivo. *Emerging microbes & infections.* 3(9), e62.

44. Ryan J, Bloch K, Archer S. (2011) Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *International journal of clinical practice*. 65(s172): 15-34.
45. Sak K, Webb T. (2002) A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Archives of biochemistry and biophysics*. 397 (1): 131-136.
46. Shephard R, Allen C, Benade A, Davies C, Di Prampero P, Hedman R, ... Simmons R. (1968) Standardization of submaximal exercise tests. *Bulletin of the World Health Organization*. 38(5): 765.
47. Szulcek R, Happé C, Rol N, Fontijn R, Dickhoff C, Hartemink K, ... Paul M. (2016) Delayed microvascular shear adaptation in pulmonary arterial hypertension. Role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 cleavage. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 193(12): 1410-1420.
48. Vaughn B Robson S, Longhi M. (2014) Purinergic signaling in liver disease. *Digestive diseases*. 32(5), 516-524.
49. Villaroel C. (2016) Caracterización de la expresión de receptores purinérgicos tipo p2y en modelo murino de hipertensión arterial pulmonar. Tesis para optar al título de tecnólogo médico. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Chile.
50. Visovatti S, Hyman M, Goonewardena S, Anyanwu A, Kanthi Y, Robichaud P, Wang J, Petrovic- Djergovic D, Rattan R, Burant C, Pinsky D. (2016) Purinergic Dysregulation in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 311(1): H 286 – 98.
51. Vignozzi L, Morelli A, Cellai I, Filippi S, Comeglio P, Sarchielli E,... Maggi M. (2017) Cardiopulmonary protective effects of the selective FXR agonist obeticholic acid in the rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 165: 277-292.
52. Wildman SP, King B. (2008) P2X receptors: epithelial ion channels and regulators of salt and water transport. *Nephron Physiology*. 108(3): 60 - 67.
53. Webb R. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*. 27 (4): 201-206.
54. Xiong C, Liu N, Fang L, Zhuang S, Yan H. (2014) Suramin inhibits the development and progression of peritoneal fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 351(2), 373-382.

55. Zagolín M, Uriarte P, Arancibia F, Castro P, Sepúlveda P, Sepúlveda L, Llancaqueo M, Sepúlveda R, Aguirre D, Cruz M. (2016) Orientaciones 2016: Manejo clínico de la hipertensión arterial pulmonar Grupo I. Ministerio de Salud, Subsecretaría de salud pública.

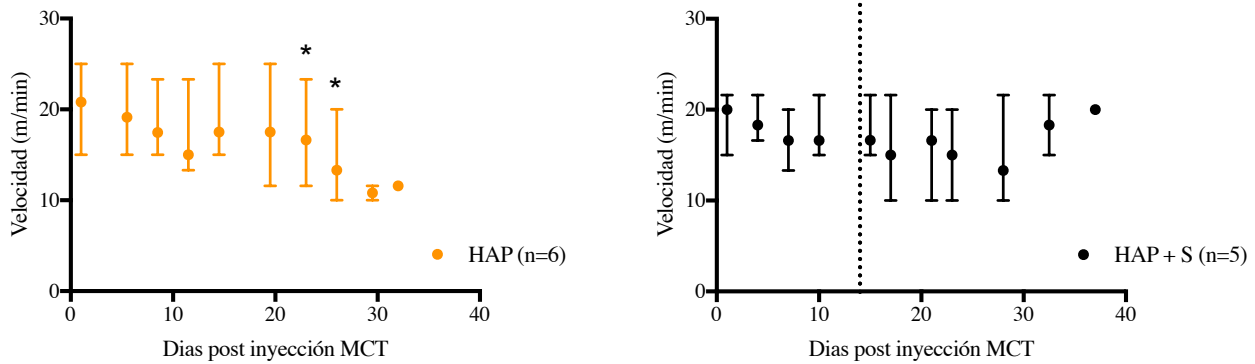
## ANEXOS

### ANEXO 1



Velocidad aeróbica máxima en ratas control (C) y ratas control con suramina (C+S). Puntos representan mediana y pestaña rango, línea punteada indica inicio de tratamiento con suramina. No se encontraron diferencias entre días de evaluación, determinada con

test de Friedman ,  $p > 0,05$  .

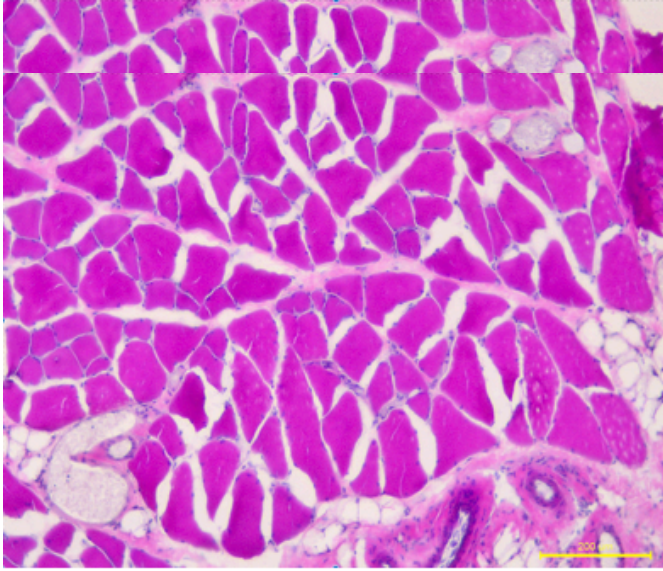


Velocidad aeróbica máxima en ratas hipertensas (HAP) y ratas hipertensas con suramina ( HAP +S). Puntos representan mediana y pestaña rango, línea punteada indica inicio de tratamiento con suramina. Diferencias entre días de evaluación, determinada con

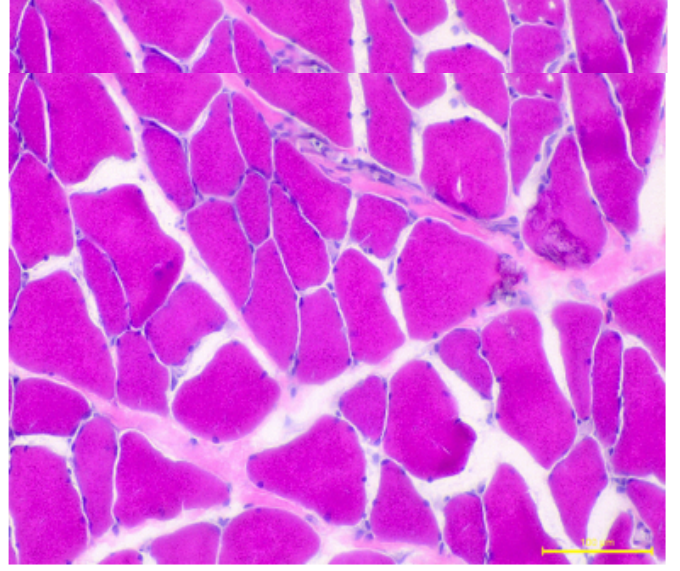
test de Wilcoxon, \*  $p < 0,05$ .

## ANEXO 2

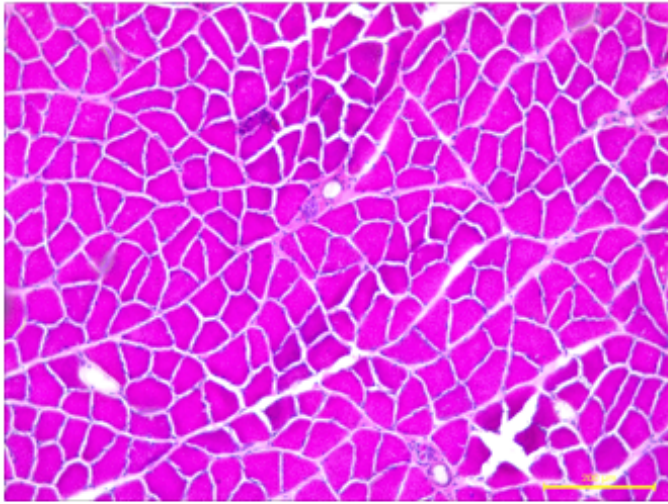
Resultados preliminares disección gastrocnemio-sóleo con tinción de Hematoxilina-Eosina.



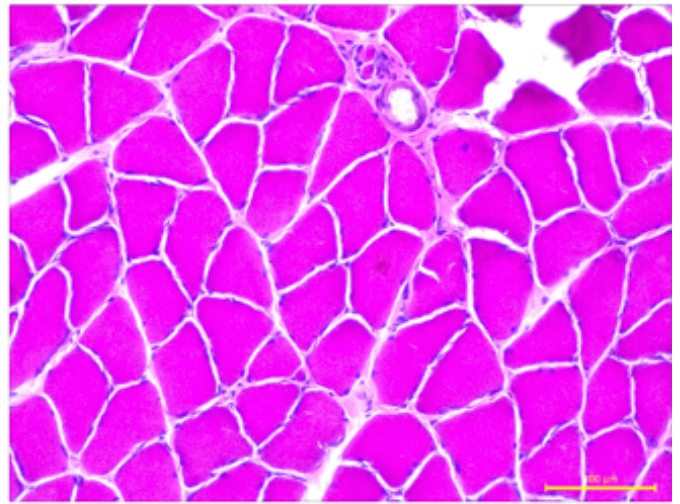
Disección gastrocnemio-sóleo rata control con tinción hematoxicilina-eosina, aumento de 10x.



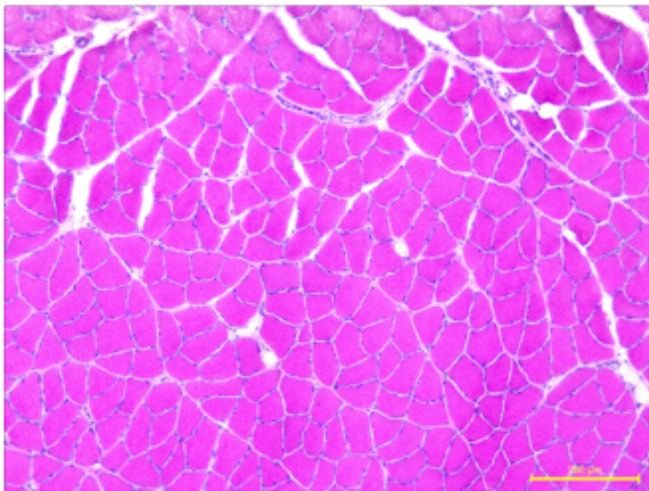
Disección gastrocnemio-sóleo rata control con tinción hematoxicilina-eosina, aumento de 20x.



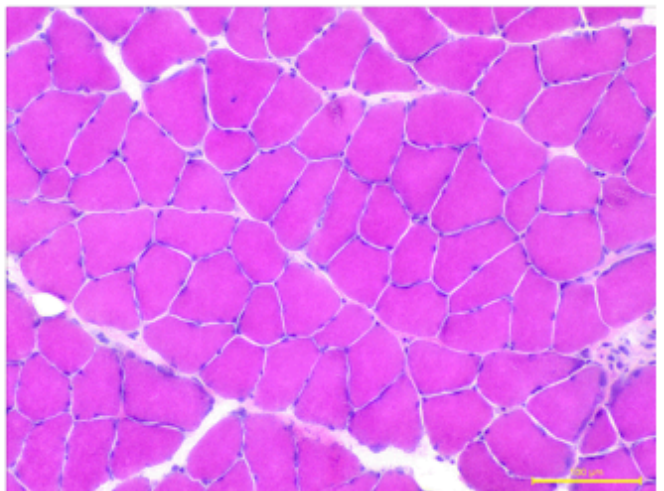
Dissección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción hematoxicilina-eosina,aumento de 10x.



Dissección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción hematoxicilina-eosina,aumento de 20x.

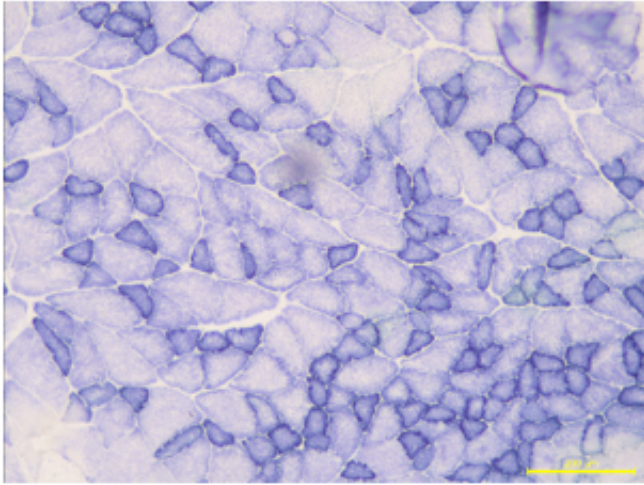


Dissección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa con suramina, tinción hematoxicilina-eosina,aumento de 10x.

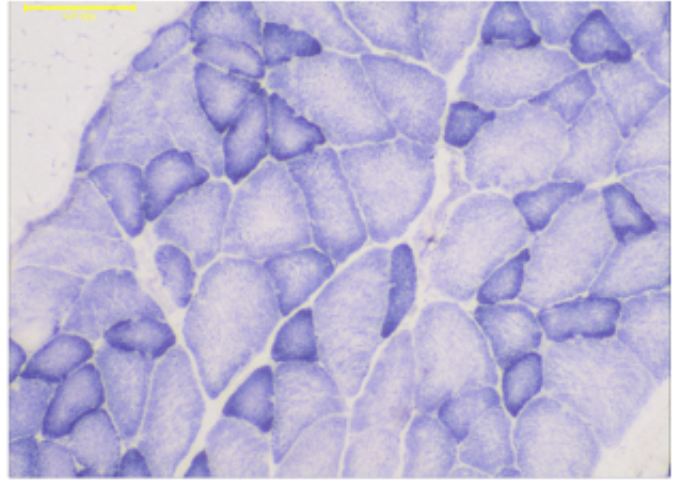


Dissección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa con suramina, tinción hematoxicilina-eosina,aumento de 20x.

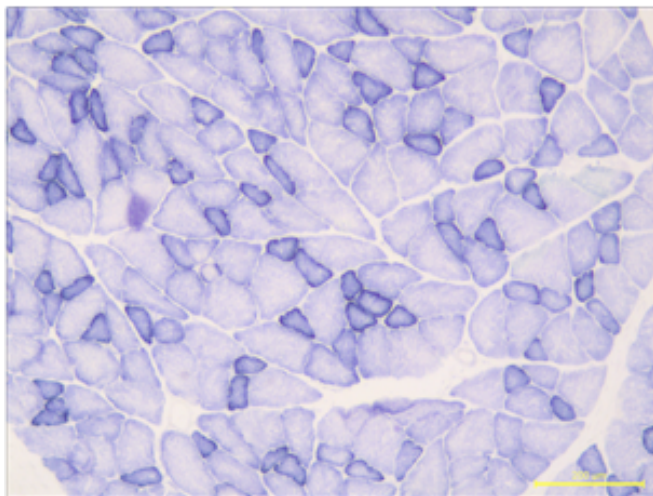
## Resultados preliminares tinción succinil deshidrogenasa (SDH)



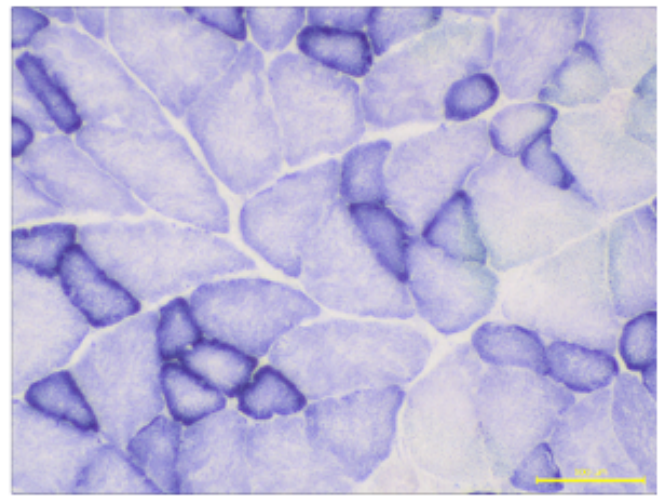
Disección gastrocnemio-sóleo rata control, tinción SDH, aumento de 10x.



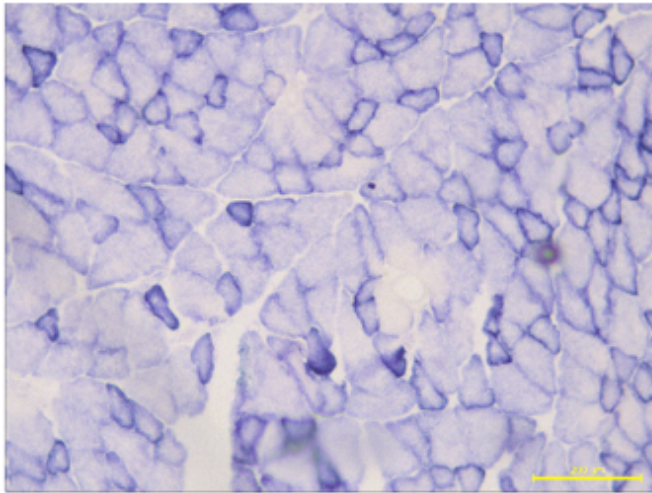
Disección gastrocnemio-sóleo rata control, tinción SDH, aumento de 20x.



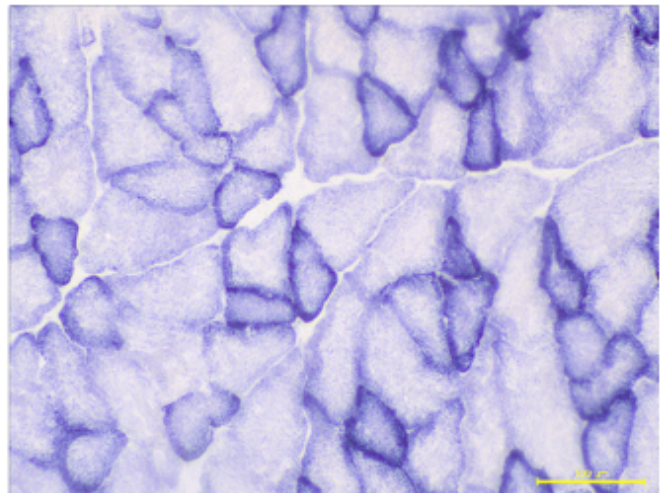
Disección gastrocnemio-sóleo rata control con suramina, tinción SDH, aumento de 10x.



Disección gastrocnemio-sóleo rata control con suramina, tinción SDH, aumento de 20x.

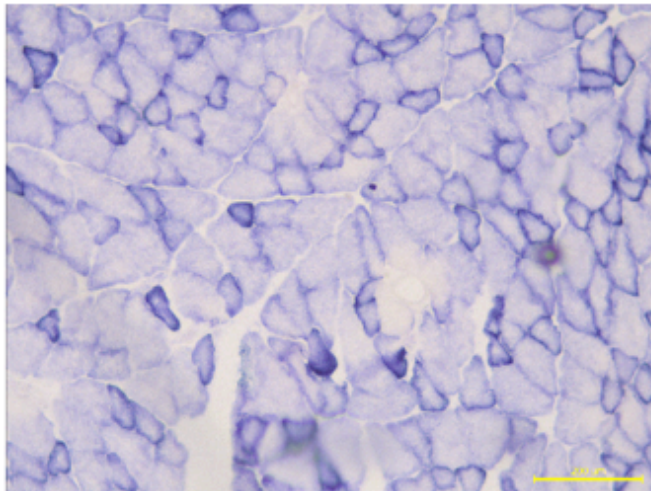


Disección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción SDH, aumento de 10x.

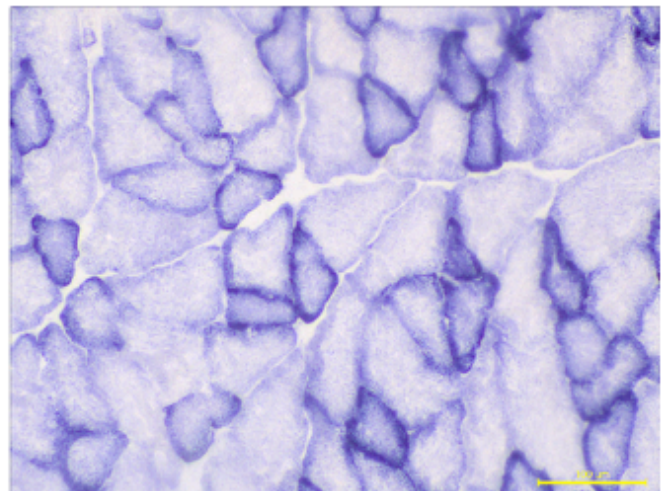


Disección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción SDH, aumento de 20x.

I



Disección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción SDH, aumento de 10x.



Disección gastrocnemio-sóleo rata hipertensa, tinción SDH, aumento de 20x.

I