

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**EFFECTO DE SILDENAFIL COMO TRATAMIENTO VASODILATADOR Y
ANTIRREMODELANTE PARA LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR
NEONATAL EN OVEJAS (*Ovis aries*) SOMETIDAS A HIPOXIA CRÓNICA**

VALENTINA NICOLE LEPE VÁSQUEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Emilio A. Herrera Videla

Co-Director de Tesis: Alejandro González-Candia

2021

DEDICATORIA

“Cada día que vives, lo que haces, marca la diferencia y tiene un impacto sobre el mundo. Tu decides que diferencia quieres hacer, que mundo quieres dejar”

Jane Goodall

AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer a mi tutor, Dr. Emilio Herrera por toda su paciencia y enseñanza en este camino desarrollando la tesis, al igual que mi co-tutor el Dr. Alejandro González-Candia. Gracias a ellos, el poder finalizar esta tesis es posible.

Agradezco a todo el equipo que he conocido en el laboratorio de función y reactividad vascular, me hubiese gustado pasar mas tiempo ahí, si el COVID lo hubiese permitido.

A la comisión evaluadora, por todas las críticas y consejos para poder terminar este trabajo de la mejor manera posible, cumpliendo con estándares y entregando una tesis que aporte en la investigación de esta área.

A mi tutora, Dra. Gina Sánchez, por guiarme en este camino de magíster, ayudándome y guiándome a tomar mejores decisiones, a integrar conocimiento y por recibirme también en su laboratorio

También dar las gracias a todos los profesores con los que me tocó compartir y aprender de ellos, ha sido un camino muy gratificante en con todo lo aprendido, gracias por el incalculable conocimiento que me brindaron en todas sus clases.

A Francisco, por toda la paciencia, apañe, cariño y ayudarme a superar esta etapa.
A mi familia que siempre han estado para apoyarme.

Gracias infinitas.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
Hipoxia crónica de altura.....	7
Gestaciones en tierras altas e hipertensión arterial pulmonar del neonato	8
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
METODOLOGÍA	17
Animales	17
Preparación quirúrgica	17
Determinaciones <i>in vivo</i>	19
Determinaciones <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	22
Miografía de alambre.....	22
Expresión de proteínas en tejido pulmonar.....	22
Histología:.....	24
Análisis Estadístico.....	25
Participación de la estudiante	26
RESULTADOS	27
Determinaciones <i>in vivo</i>	27
Determinaciones <i>ex vivo</i>	35
Determinaciones <i>in vitro</i>	38
RESULTADOS SUPLEMENTARIOS	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
DISCUSIÓN	42
Conclusión	51
REFERENCIAS	52

RESUMEN

La Hipertensión Arterial Pulmonar Neonatal (HAPN) es un síndrome cardiopulmonar grave, caracterizado por un aumento patológico de la presión arterial pulmonar media (mPAP>20 mmHg), que comúnmente cursa con taquipnea e hipoxemia severa de los recién nacidos. Fisiopatológicamente, existe una falla en la transición de la circulación fetal a la neonatal con la consecuente mala adaptación de los pulmones a la vida extrauterina, conservando un tono vascular pulmonar elevado con un remodelado vascular que lleva a un incremento persistente de la resistencia vascular pulmonar. Actualmente, el único tratamiento aprobado es la inhalación de óxido nítrico, el cual es muy costoso, no se encuentra disponible en todos los centros hospitalarios y posee una efectividad del 50-60%.

La causa más común de esta patología es la hipoxia crónica durante el desarrollo, por ejemplo, en gestaciones en tierras altas (>2500 metros de altitud). Bajo esta premisa y considerando que no existe un tratamiento altamente efectivo, esta tesis plantea el uso de Sildenafil, un inhibidor de la Fosfodiesterasa 5 (PDE-5), como tratamiento vasodilatador y antirremodelante de la musculatura lisa pulmonar con el fin de revertir la HAPN. De esta manera, este tratamiento pretende mejorar las variables cardiopulmonares *in vivo*, disminuir el remodelamiento vascular y mejorar la expresión de factores de transcripción o proteínas vasoactivas pulmonares que indiquen una mayor capacidad vasodilatadora.

Para lograr esto, once corderos gestados, nacidos y criados en Putre (3600 metros de altitud) fueron utilizados en este estudio. El grupo control (C, n=6) recibió vehículo y el grupo tratado recibió sildenafil (S, n=5; 1 mg/kg/12 h x 5 días EV). El tratamiento fue administrado desde el día 4 al 8 de vida, y los animales se monitorearon durante el primer mes de vida, para la evaluación cardiopulmonar de todo el período neonatal. Posterior a esto, se les realizó eutanasia para la evaluación de la función vascular pulmonar *ex vivo* mediante miografía de alambre, además del análisis morfo estructural y de expresión de proteínas vasoactivas.

El tratamiento instaurado con sildenafil no logró reducir la mPAP de manera significativa *in vivo*, sin efectos adversos en las variables sistémicas. Sin embargo, al evaluar su efecto de manera aguda, sildenafil genera una disminución estadísticamente significativa al comparar valores de mPAP basales versus infusión y post-infusión. Por otro lado, la función vasoconstrictora *ex vivo* presentó una mayor capacidad contráctil en el grupo S estadísticamente significativa. Al mismo tiempo, las arterias tratadas con sildenafil presentaron una dilatación dependiente e independiente de endotelio significativamente mayor que las arterias control, evidenciando una mejora de la disfunción endotelial. Finalmente, sildenafil indujo una disminución del diámetro vascular, con una mayor área de capa adventicia porcentual de manera significativa versus el grupo control, sin cambios en la expresión de las proteínas asociadas a la vía oxido-nitrérgica, exceptuando la expresión de PDE-5 la cual fue estadísticamente menor en este grupo.

En conclusión, sildenafil indujo modificaciones que podrían considerarse positivos para los mecanismos determinantes de la fisiopatología de la HAPN. No obstante, estos cambios no se manifestaron en una mejoría clínica.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension of the newborn (PAHN) is a severe cardiopulmonary syndrome characterized by a pathological increase in mean pulmonary arterial pressure (mPAP>20 mmHg), which commonly courses with tachypnea and severe hypoxemia in newborns. Pathophysiologically, there is a failure in the fetal to neonatal circulation transition with the consequent poor adaptation of the lungs to extrauterine life, preserving an elevated pulmonary vascular tone with vascular remodeling that derives in a persistent increased in pulmonary vascular resistance. Currently, the only approved treatment is inhaled nitric oxide, which is very expensive, is not available in all health centers and has only 50-60% effectiveness.

The most common cause of this pathology is chronic hypoxia during development, for example, in gestations at highlands (>2500 m above sea level). Under this premise and considering that there is no highly effective treatment, this thesis proposes using Sildenafil, a phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor, as a vasodilator and anti-remodeling treatment to reverse PAHN at high-altitudes. In this way, this treatment aims to improve cardiopulmonary variables in vivo, decrease vascular remodeling and improve the expression of transcription factors or pulmonary vasoactive proteins towards an improved vasodilatory capacity.

To achieve this, eleven lambs gestated, born and raised in Putre (3600 m above sea level) were used in this study. The control group (C, n=6) received vehicle, and the treated group received sildenafil (S, n=5; 1 mg/kg/12 h for 5 days, IV). Treatments were administered from day 4 to 8 of life, and the animals were monitored during the first postnatal month to evaluate cardiopulmonary function during the neonatal period. After this, they were euthanized for ex vivo evaluation of pulmonary vascular function by wire myography, morphostructural analysis and vasoactive protein expression.

The findings showed that sildenafil failed to reduce PAP significantly in vivo, with no adverse effects on systemic variables. However, when evaluating the acute effects, sildenafil induces a significant decrease when comparing infusion and post-infusion with baseline in mPAP values. On the other hand, the treatment induced ex vivo a significant increase in contractile capacity. In addition, sildenafil-treated arteries

showed significantly greater endothelium-dependent and -independent dilatation than control arteries, evidencing an improvement in endothelial dysfunction. Moreover, sildenafil induced a decrease in vascular diameter, with a significantly great area of the adventitial layer than the control group, without changes in the expression of proteins associated with the oxide-nitric pathway, except for the expression of PDE-5 which was statistically lower in this group.

In conclusion, the proposed treatment generated changes that could be considered positive for the mechanisms determining the pathophysiology of PAHN. However, these changes did not translate into a clinical improvement.

ABREVIATURAS

5HT: Serotonina

cGMP: Guanosina 3,5 monofosfato cíclica

CML: Célula muscular lisa

CRC: Curvas de respuesta a concentración-acumulativa

DA: Ductus arterioso

DE: Diámetro externo

DI: Diámetro interno

EC50: Concentración media máxima efectiva

ECMO: Oxigenación de membrana extracorpórea

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

E_{max}: Tensión máxima efectiva

eNO_S: Óxido nítrico sintasa endotelial

EPO: Eritropoyetina

ERH: Elemento respondedor a hipoxia

ET-1: Endotelina 1

ET_a: receptor de endotelina a

ET_b: receptor de endotelina b

EV: Endovenoso

FC: Frecuencia cardíaca

FDA: Agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos

GC: Gasto cardíaco

HAPN: Hipertensión Arterial Pulmonar Neonatal

HIF: Factor inducible por hipoxia

IO: Índice de oxigenación

KDa: Kilodalton

MetCh: Metacolina

MLCP: Fosfatasa de la cadena liviana de miosina

mPAP: Presión arterial pulmonar media

mPAS: Presión arterial sistémica media

msnm: Metros sobre el nivel del mar

NFκB: Factor de transcripción nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

NO_i: Óxido nítrico inhalado

PAF: Factor de agregación plaquetaria

PAP: Presión arterial pulmonar

PAS: Presión arterial sistémica

PAS: Presión arterial sistémica

PDE-5: Fosfodiesterasa tipo 5

PGs: Prostaglandinas

PKG: Proteína kinasa G

RNS: Especies reactivas derivadas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RVP: Resistencia vascular pulmonar

RVS: Resistencia vascular sistémica

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo

sGC: Guanilato ciclasa soluble

sGC: Guanilato ciclasa soluble

SNP: Nitroprusiato de sodio

TxA₂: Tromboxano

VPH: vasoconstricción pulmonar hipóxica

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

Hipoxia crónica de altura

La hipoxia crónica de altura (hipoxia hipobárica) se define como la disminución del aporte de oxígeno condicionado a una disminución de la presión barométrica, resultando en una caída de la presión de oxígeno inspirado (Hill y cols, 2016). Esta condición se observa a partir de los 2500 metros sobre el nivel del mar, donde aparecen manifestaciones clínicas producto de esta falta de oxígeno, como aumento de la frecuencia respiratoria, hiperventilación, policitemia, y aumento de síntesis de sustancias eritropoyéticas, entre otros. Esta condición aumenta la morbilidad y mortalidad de aproximadamente 170 millones de personas en el mundo que residen permanentemente en altitud geográfica (Burtscher, 2014; Herrera y cols, 2015; West, 2016).

La regulación y preservación de la homeostasis de oxígeno tiene un rol importante en el destino de las células, es por ello, que estas pueden adaptarse a la deprivación de oxígeno, modulando la actividad de ciertas proteínas a nivel transcripcional o post-transcripcional. La respuesta celular a la hipoxia consiste en la activación de múltiples genes relacionados con angiogénesis, metabolismo de glucosa, proliferación y apoptosis celular (Corrado y Fontana, 2020). El factor regulador principal que media esta respuesta es el Factor Inducible por Hipoxia (HIF), el cual responde frente a bajos niveles de oxígeno, inhibiendo su hidroxilación. Esto determina la estabilización de HIF-1- α y su traslocación al núcleo celular, donde se dimeriza con la subunidad beta (Corrado y Fontana, 2020, West, 2016). Este complejo heterodimérico se une a regiones específicas del ADN (Elemento respondedor de hipoxia, ERH) resultando en su regulación transcripcional, determinando la inducción de diferentes genes diana, como Eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) los cuales provocaran la activación de una serie de vías adaptativas de hipoxia con el fin de restaurar la homeostasis celular (Corrado y Fontana, 2020, West, 2016).

Gestaciones en tierras altas e hipertensión arterial pulmonar del neonato

Durante la vida intrauterina, la placenta es el principal órgano funcional de intercambio gaseoso para el feto, mientras que la circulación pulmonar fetal se caracteriza por tener una resistencia vascular alta y un flujo sanguíneo pulmonar bajo. Esto ocurre principalmente porque el 85-90% del gasto cardíaco se desvía por el ductus arterioso hacia la aorta descendente fetal, por lo que el flujo sanguíneo pulmonar no es mayor al 10% del gasto cardíaco combinado (Abman, 1999; Dakshinamurti, 2005; Heymann, 1999). Por lo tanto, la sangre oxigenada proveniente de la madre desde la arteria uterina que fluye hacia el espacio placentario, transfiriendo el oxígeno a través de un gradiente de concentración hasta la vena umbilical. La sangre venosa umbilical tiene una saturación de oxígeno del 70 al 80%, la cual se distribuye a nivel hepático, irrigando este órgano e ingresando a la circulación sistémica a través del ductus venoso (Figura 1) (Morton y Brodsky, 2016).

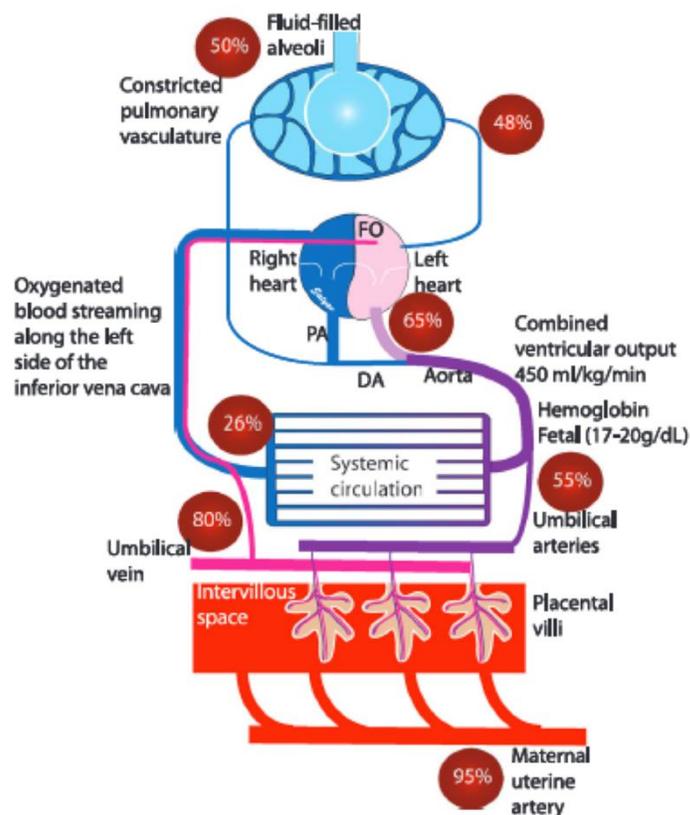


Figura 1. Esquema de la Circulación intrauterina donde la placenta y la permeabilidad de los principales intercomunicaciones vasculares y forámenes son vitales para mantener la oxigenación del feto y sus principales órganos (Imagen obtenida de Sharma, 2015).

Los factores encargados de mantener una resistencia vascular pulmonar alta en la vida intrauterina son variados, entre ellos una baja presión de oxígeno y un aumento de agentes vasoactivos como endotelina-1 (ET-1), factor de activación plaquetaria (PAF) y las especies reactivas de oxígeno (ROS)(Jain y McNamara, 2015). Los efectos de ET-1 en la resistencia vascular pulmonar ocurren mediante dos subtipos de receptores, ETa y ETb, donde Eta son encontrados en la célula muscular lisa y los receptores ETb en las células endoteliales y CML. La unión de endotelina a su receptor activa la fosfolipasa C lo que lleva a un aumento del inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) y calcio intracelular, generando vasoconstricción. El aumento de DAG y calcio conlleva también a la estimulación de la proteína kinasa C, la cual se considera la mediadora de la acción mitogénica de ET-1 (Galié y cols, 2004). Por lo tanto, la activación de los receptores Eta promueve la vasoconstricción, mientras que la activación de los receptores ETb favorece la vasodilatación.

A su vez, la condición de hipoxemia fetal relativa también mantiene una baja producción pulmonar de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGs)(Steinhorn, 2010). La mantención de este tono vascular aumentado en el pulmón es resultado de la distensión de este mismo por la presencia de fluido en el árbol bronquial, secretado por las células pulmonares epiteliales el cual es de vital importancia para el desarrollo y maduración de éste (Morton y Brodsky, 2016).

Durante el parto, se inicia el aclaramiento de los fluidos pulmonares, el cual es completado aproximadamente a las 2 horas de edad. Este proceso se inicia principalmente al establecerse un cambio en el epitelio pulmonar, de secretor activo a absorción activa, mediando por canales de sodio transporte activo, *clearance* que disminuye la resistencia vascular pulmonar (Morton y Brodsky, 2016; Hillman y cols, 2012).

En la transición cardiopulmonar feto-neonato, a los pocos minutos luego de nacer, el sistema circulatorio del feto sufre importantes cambios estructurales y funcionales, gracias al aumento de la presión de oxígeno, iniciando la ventilación y oxigenación por parte de los pulmones, se gatilla el cierre funcional del ductus arterioso y la caída de

la resistencia vascular pulmonar, incrementando así el flujo sanguíneo pulmonar en 8 a 10 veces (Hanson y cols, 1998; Heymann, 1999; Steinhorn, 2010; Storme y cols, 2013). Además, el pinzamiento del cordón umbilical gatilla un aumento en la resistencia vascular sistémica, aumentando también la presión arterial sistémica. (Alvaro y Rigatto, 2005). Todo lo anterior causa un aumento del estrés tangencial o “*shear stress*” y con ello, la inducción de la expresión y activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), produciendo así óxido nítrico (NO), a través de la conversión de L-arginina a L-citrulina. A nivel intracelular, el NO activa la guanilato ciclasa soluble (sGC), produciendo un cambio conformacional en su sitio catalítico, permitiendo la conversión de guanosina 5 trifosfato a guanosina 3,5 monofosfato cíclica (cGMP), aumentando así la concentración de cGMP celular hasta 100 veces, reduciendo la cantidad de calcio intracelular y permitiendo una relajación de la musculatura vascular pulmonar (Figura 2) (Hanson y cols, 1998; Morton y Brodsky, 2016; Nair y Lakshminrusimha, 2014; Puthiyachirakkal y Mhanna, 2013; Steinhorn, 2010). La presión arterial pulmonar alcanza la mitad del valor de presión arterial sistémica a las 24 horas luego de nacer, alcanzando niveles normales (10-12 mmHg) a las 2 semanas en la mayoría de los recién nacidos sanos (Morton y Brodsky, 2016).

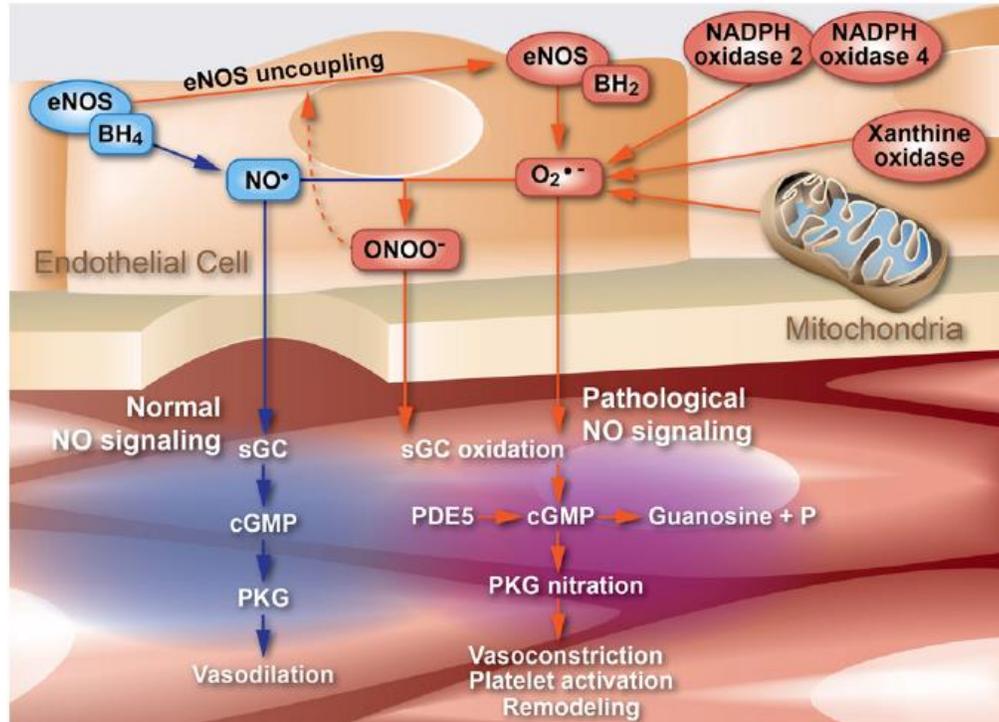


Figura 2. Imagen representativa de la vía de señalización normal del óxido nítrico (NO) y los efectos de las especies reactivas de oxígeno y PDE-5 en la vasoconstricción y remodelamiento (Imagen obtenida de Tabima y cols, 2012).

La falla en la disminución de la resistencia vascular pulmonar determina Hipertensión Arterial Pulmonar del Neonato (HAPN), la cual es producida por la mantención de una resistencia vascular pulmonar alta, usualmente con la mantención de la permeabilidad del foramen oval y ductus arterioso y una hipoxemia severa manifestada fundamentalmente en el hemicuerpo inferior (Abman, 1999; Engelbrecht y Paed, 2008). Este síndrome puede ser muy severo y generar una dificultad respiratoria grave, comprometiendo la vida del neonato (Nair y Lakshminrusimha, 2014; Puthiyachirakkal y Mhanna, 2013; Steinhorn, 2010), con una tasa de mortalidad del 11 al 48% (Jain y McNamara, 2015; Walsh-Sukys y cols, 2000).

La HAPN se define como un síndrome donde la PAP media alcanza valores por sobre los 20 mmHg (Simonneau, 2019), caracterizada por una elevada RVP, reactividad vascular anormal y remodelamiento del músculo liso vascular (Lakshminrusimha y cols, 2016; Lan y cols, 2018; Thenappan y Archer, 2018). Dentro de sus causas más frecuentes está la hipoxia crónica durante el desarrollo intrauterino (Hutter y cols,

2010). Los recién nacidos, usualmente presentan síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), cianosis, con diferencias en la saturación de oxígeno, principalmente mayores en las zonas pre-ductales (mano derecha) comparada con las zonas post-ductales (hemicuerpo inferior), con una gradiente de oximetría >3%. (Lakshminrusimha, 2021).

La hipoxia crónica conlleva a que la patogénesis de la HAPN sea una suma de cambios vasoactivos, como la vasoconstricción marcada, remodelamiento vascular, angiogénesis y vasculogénesis (Cabral y Belik, 2013). La característica vascular más común en el territorio pulmonar asociada a la exposición de hipoxia crónica es la “muscularización” de segmentos vasculares (Stenmark et al, 2006), donde sustancias como Endotelina (ET-1), serotonina (5Ht) y tromboxano (TxA2) pueden mediar el aumento del tono vascular y la proliferación de la musculatura lisa, además de la sobreproducción de componentes de matriz extracelular (Pak y cols, 2007). Esto genera un desbalance vasoactivo, favoreciendo la hipertrofia muscular y la remodelación característica de esta patología, con engrosamiento de capa media arteriolar y depósito de colágeno intersticial (González-Candia y cols, 2020; Herrera y cols, 2008). La respuesta celular de 5HT es a través del aumento de la fosfolipasa C acoplada a proteína G, produciendo DAG e IP3, el que se unirá a receptores específicos del retículo endoplásmico de la CML, produciendo liberación de calcio y su aumento citosólico, el que en conjunto con DAG activarán a la proteína kinasa C (PKC) fosforilando proteínas dianas específicas (Beñaldo y cols, 2017).

De acuerdo a datos del Ministerio de Salud de Chile, en nuestro país mueren al año cerca de 130 RN de más de 2.000 g de peso a causa de insuficiencia respiratoria grave (Kattan, 2005). Por otro lado, en altitudes mayores a 2500 metros sobre el nivel del mar (msnm), la tasa de mortalidad de recién nacidos con afecciones respiratorias como la HAPN puede alcanzar 33 muertes cada 1000 nacidos vivos y sobre 44 muertes si la altura supera los 3500 msnm (Bourjeily y Rosene-Montella, 2009; Hutter, 2010; Keyes y cols, 2003). Bajo este contexto, la gestación y el nacimiento en tierras altas son asociadas a resultados fetales y maternos adversos, la cual es la condición hipóxica

crónica más estudiada durante el embarazo. Sin embargo, aun no existe un tratamiento altamente efectivo para dicha signología y complicaciones.

Las estrategias terapéuticas de la HAPN están orientadas a disminuir selectivamente el tono vascular pulmonar, en conjunto con un manejo médico global, de estabilidad hemodinámica, uso de altas concentraciones de oxígeno, surfactante, ventilación mecánica y, en casos más graves, la oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO)(Engelbrecht, 2008; Sharma y cols, 2015; Steinhorn, 2010). Sin embargo, el uso de oxígeno se ha vuelto cada vez más controversial, considerando que fracciones inspiradas sobre 50% agrava el estado oxidativo del organismo del neonato, aumentando ROS, los que atenúan la respuesta vascular tanto al NO endógeno como exógeno (Teixeira-Mendonça y Henriques-Coelho, 2013; Gordo-Vidal y cols, 2010). A la vez, esto podría incrementar la formación de especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS), como peroxinitrito (Lakshminrusimba y cols, 2016).

Para el de HAPN, el óxido nítrico inhalado (NO_i) es la única terapia aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA), actuando selectivamente como vasodilatador sobre la circulación pulmonar, sin disminuir la presión arterial sistémica. Este tratamiento aumenta el cGMP intracelular en la célula muscular lisa de las arterias pulmonares, produciendo una relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos (Figura 2). De esta manera, se logra disminuir la resistencia vascular, mejorando la perfusión pulmonar hacia sectores ventilados del pulmón y con ello, optimizando el cociente de ventilación/perfusión (Jain y McNamara, 2015; Lakshminrusimha y Keszler, 2015; Thenappan, 2018). La administración de NO_i a dosis por sobre las 5 ppm, reduce significativamente el resultado combinado de muerte y necesidad de ECMO en un 35% de los recién nacidos (Wu y cols, 1995). Sin embargo, cerca del 40% de los RN no responden a esta terapia (Teixeira-Mendonça y Henriques-Coelho, 2013; Wu, 1995), donde algunos pacientes presentan un efecto rebote debido a la supresión de la producción de NO endógeno (Kelly y cols, 2017).

Dentro del uso de drogas vasodilatadoras, los inhibidores de la fosfodiesterasa, son una amplia familia dentro de la cual han sido identificadas 11 isoenzimas. La Fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) se expresa en los pulmones, plaquetas, músculo liso

vascular y el miocardio, ejerciendo su función a través de la hidrólisis del cGMP. Esta acción de PDE-5 lleva a un aumento de la degradación de cGMP. Por lo tanto, los inhibidores de PDE-5, se oponen a estos efectos vasoconstrictores en la musculatura lisa pulmonar vascular, aumentando las concentraciones de cGMP, mejorando la función cardíaca y la hipertensión pulmonar refractaria a NOi (Buckley y cols, 2010; Juliana y Abbad, 2015; Storme y cols, 2013). También los inhibidores de PDE-5 disminuyen la hipertrofia y la remodelación vascular en neonatos que han sufrido hipoxia intrauterina, aunque su mecanismo no está totalmente dilucidado (Herrera y cols, 2008). Una ventaja de su uso versus otras drogas con similar mecanismo de acción, disminuyendo la PAP, como los antagonistas de endotelina (Bosentan, Ambrisentan) es que sildenafil se considera más seguro, al no requerir un monitoreo mensual de la función hepática (Ramani y Park, 2010). Basado en la evidencia disponible, el uso de sildenafil tiene ciertas indicaciones como terapia adyuvante junto a NOi, donde se describe un efecto sinérgico (Dhillon, 2012) en pacientes resistentes a NOi o para facilitar el destete de su uso.

Existe escasa literatura acerca de la farmacocinética y farmacodinamia de sildenafil en población pediátrica, por lo que su eficacia y seguridad no han sido bien establecidas (Márquez-González y cols, 2020) ante lo cual, según la severidad de la patología, se ha establecido iniciar con dosis de 0.5 mg/kg hasta 6 mg/kg totales, considerando un rango horario inicial cada 12 horas pudiendo establecerse hasta cada 6 horas (Baquero y cols, 2006; Dhariwal y Bavdekar, 2015)

Es importante recalcar que el año 2012, la FDA limitó el uso de sildenafil en pacientes pediátricos, advirtiendo que no se recomienda en terapias crónicas, basado en un aumento de la mortalidad detectado en un ensayo clínico donde se usó en dosis altas. Sin embargo, los profesionales de la salud que necesiten de este fármaco para sus pacientes, deben evaluar los posibles riesgos potenciales y si el beneficio de su uso supera el riesgo asociado (Abman y cols, 2013).

Es importante hacer hincapié que existen casos en que NOi no está disponible, donde se ha utilizado sildenafil como único agente de tratamiento en neonatos críticos con HAPN (Rath y Kluckow, 2018). Sin embargo, cuando es utilizado como único agente,

se desconoce si una vez retirado el tratamiento con sildenafil, sus efectos se mantienen y no presenta efecto rebote frecuente, similar al NOi, en neonatos gestados, nacidos y mantenidos en altura.

Por lo tanto, en esta Tesis se evalúa la efectividad de un tratamiento con sildenafil como agente único durante la primera semana de vida en corderos con HAPN; etapa más severa y crítica; por haber gestado y nacido en hipoxia crónica de altura geográfica. Además, se realizará el seguimiento de estos corderos hasta un mes de vida en tierras altas, para poder evaluar los efectos una vez retirado el tratamiento, tanto en variables cardiopulmonares como cambios en la morfología y funcionamiento de la musculatura lisa vascular pulmonar.

HIPÓTESIS

La administración de sildenafil como terapia única para la hipertensión arterial pulmonar neonatal causada por hipoxia crónica gestacional, disminuye la presión arterial pulmonar, aumenta la función vasodilatadora y reduce el remodelamiento vascular pulmonar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración de sildenafil disminuye la presión arterial pulmonar, aumenta la función vasodilatadora y reduce el remodelamiento pulmonar en neonatos de oveja con hipertensión pulmonar neonatal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de sildenafil sobre las variables cardiopulmonares *in vivo* de neonatos gestados en hipoxia crónica.
2. Determinar el efecto de sildenafil en la función vasoactiva (vasoconstricción y vasodilatación) en arterias pulmonares pequeñas *ex vivo* de neonatos gestados en hipoxia crónica.
3. Determinar el efecto de sildenafil en la expresión de proteínas relacionadas a la vía vasodilatadora oxido-nitrérgica en tejido pulmonar de neonatos gestados en hipoxia crónica.
4. Determinar el efecto de sildenafil sobre las características morfo-estructurales de arterias pulmonares pequeñas *in vitro* de neonatos gestados en hipoxia crónica.

METODOLOGÍA

Todos los procedimientos de cuidado y experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (CBA # 0761 FMUCH, anexo 1) y llevado a cabo según las normas internacionales de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH) publicación No. 85-23, revisada en 1996). Este proyecto fue financiado por los Proyectos FONDECYT 1151119 y 1201283, ambos dirigidos por el Dr. Emilio Herrera.

Animales

Se utilizaron 11 recién nacidos de oveja (*Ovis aries*) con HAPN, los cuales fueron gestados, nacidos y estudiados en hipoxia crónica de altura (Putre, 3600 msnm) y divididos en dos grupos al azar. El grupo control recibió el vehículo (C, n = 6, 1 ml NaCl 0.9% I / kg) y el grupo tratado recibió una dosis de sildenafil (S, n = 5, Sildenafil 1 mg / kg en NaCl 0.9% 1 ml / kg). Los tratamientos se administraron de manera endovenosa (EV) cada 12 horas durante 5 días (desde los días 4 a 8 post natal) (Figura 3). Los animales fueron pesados y examinados todas las mañanas por un Médico Veterinario.

Preparación quirúrgica

Al tercer día de nacidos, los corderos fueron sometidos a un procedimiento bajo anestesia general para la colocación de un catéter Swan Ganz (cardio-pulmonar) y catéteres arterial y venoso sistémicos centrales (aorta y cava, vía vasos femorales). Esta cirugía se realizó bajo anestesia general utilizando un protocolo con xilacina 0.04 mg/kg y ketamina 10 mg/kg y bajo estrictas medidas asépticas.

Modelo Experimental

Putre, 3600 msnm

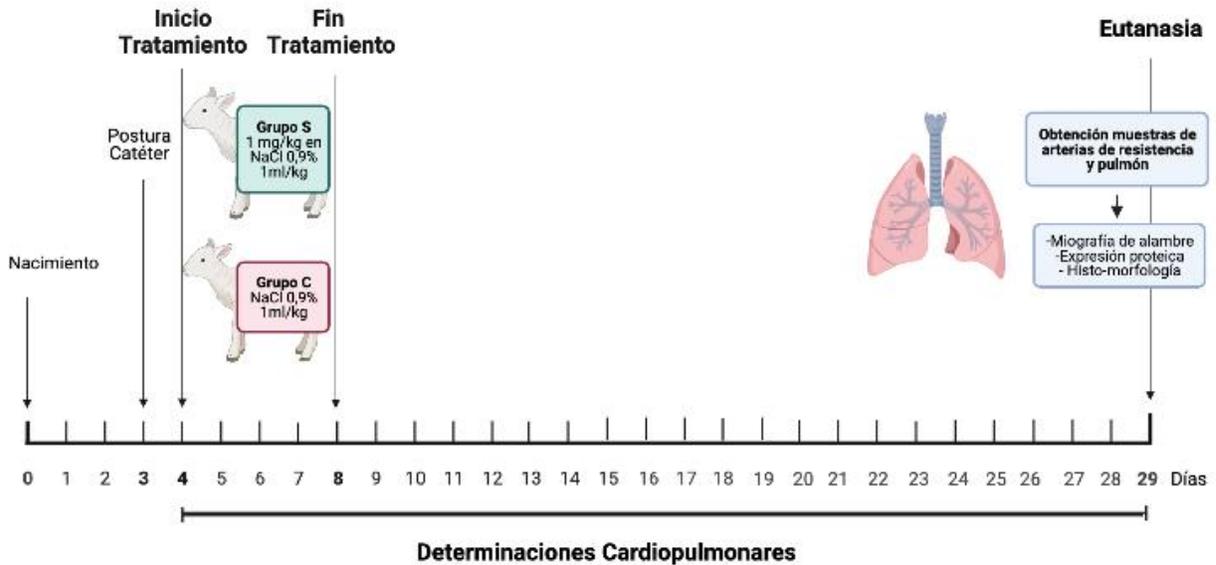


Figura 3. Modelo experimental. Esquema temporal del protocolo experimental en los neonatos de ovejas. Al día 3 de vida, se les instalaron catéteres vasculares a los corderos. Los tratamientos se administraron diariamente durante los días 4 a 8 postnatal, para el grupo control (C, n=6) y el grupo sildenafil (S, n=5). Se monitorearon las variables cardiovasculares diariamente desde el día 4-29 postnatal. El día 29 se realizó la eutanasia y se recolectó tejido pulmonar para determinaciones de función vascular (miografía de alambre), expresión proteica (Western Blot) y estructura vascular (Histo-morfología).

Luego de anestesiarse a los recién nacidos, en el sitio quirúrgico se realizó tricotomía y asepsia con clorhexidina al 2%, para luego realizar una infiltración local con lidocaína 2%, permitiendo obtener un bloqueo local a nivel de la dermis. El catéter Swan-Ganz fue insertado en la vena yugular derecha (Swan-Ganz 5F, Baxter), el cual consta de una luz proximal (aproximadamente a 30 cm de la punta del catéter), una luz distal (punta del catéter), un balón, situado a 2 cm de la punta de éste y un termistor (resistencia electrónica utilizado como sensor de temperatura) (Figura 4). Al llegar al atrio derecho, se procede a inflar el balón de látex el cual permite el avance del catéter, impidiendo que choque con las estructuras intravasculares. A medida que el catéter es introducido, se observan diferentes morfologías de curva de presión, indicando la ubicación anatómica en la cual se encuentra éste (Figura 5). Finalmente, la luz distal

del catéter quedará posicionado en la arteria pulmonar y la luz proximal a nivel de la aurícula derecha (Herrera y cols, 2007; Herrera y cols, 2008; González-Candia y cols, 2020).

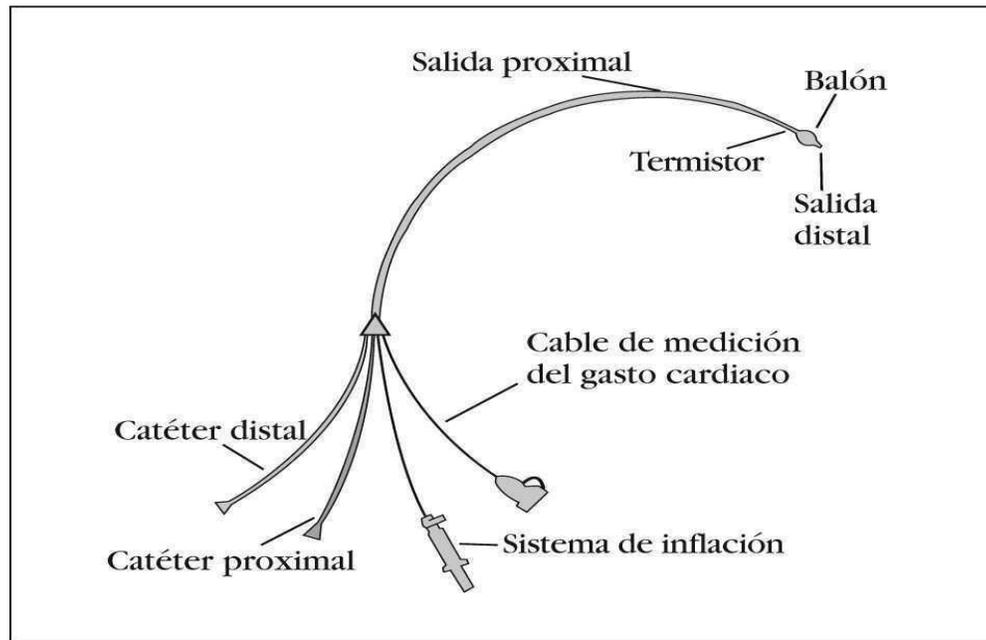


Figura 4. Características del catéter Swan-Ganz. El catéter Swan-Ganz posee 3 lúmenes (1 distal, 1 proximal y el sistema de inflación), además de un termistor. Este catéter permite la determinación invasiva de la presión arterial pulmonar y el gasto cardíaco por el método de termodilución (imagen obtenida de Dones y cols, 2008).

Determinaciones *in vivo*

A través de los catéteres instalados se obtuvieron las determinaciones de variables cardiovasculares como presión arterial pulmonar (PAP) y sistémica (PAS) y frecuencia cardíaca (FC), con el uso de transductores de presión conectados a un sistema de adquisición de datos (PowerLab 8/35, ADInstruments).

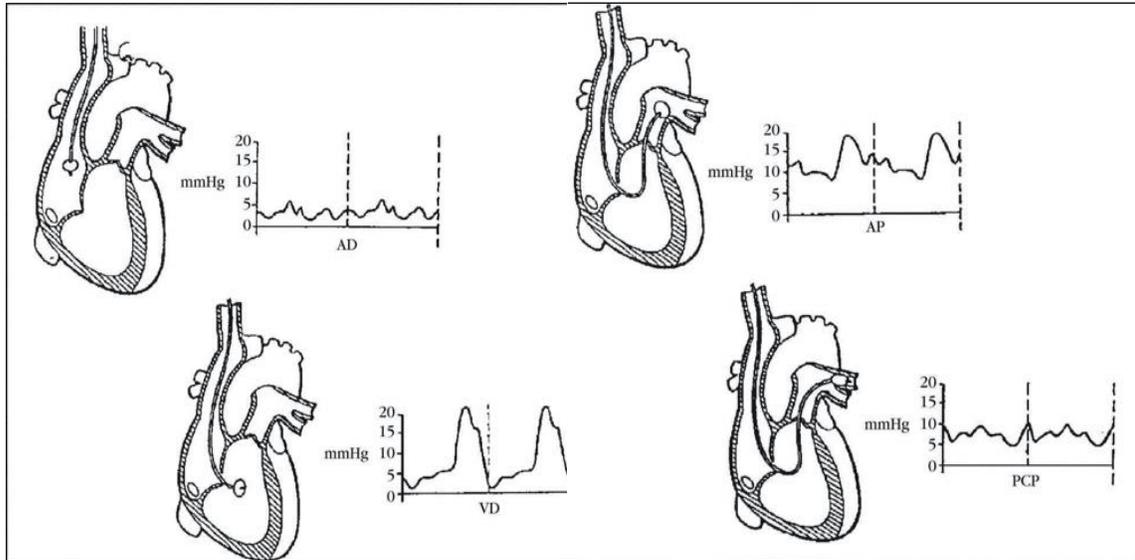


Figura 5. Morfología curva de presión de catéter Swan-Ganz según ubicación anatómica. El registro de presión en tiempo real permite la introducción del catéter en arteria pulmonar (AP), pasando por vena yugular, aurícula derecha (AD), ventrículo derecho (VD). Además, es posible determinar la presión de enclavamiento (PCP) (imagen obtenida de Dones y cols, 2008).

El gasto cardíaco (GC) fue determinado por termodilución en triplicado (COM-2, Baxter) y expresado en ml/min por kg de peso corporal. La medición de GC es posible realizarla, ya que, en el extremo distal del catéter Swan-Ganz, se ubica un termistor el cual puede detectar cambios de la temperatura sanguínea en la arteria pulmonar. Luego de una inyección en aurícula derecha de suero frío (3 ml 0°C), se genera una variación de temperatura, mediante la cual, aplicando el principio de la termodilución, es posible obtener un valor numérico y morfología de curva que a partir de su integración computacional del área bajo la curva y la ecuación modificada de Stewart-Hamilton, permite obtener un valor de GC (Argueta y Paniagua, 2019).

Con estos datos, además, se calcularon las presiones arteriales medias pulmonar (mPAP) y sistémica (mPAS), además de las resistencias vasculares medias pulmonar (RVP) y sistémica (RVS), según las siguientes fórmulas:

$$mPAP \text{ (mmHg)}: \frac{sPAP + 2dPAP}{3}$$

$$mPAS \text{ (mmHg)}: \frac{PAS + 2PAD}{3}$$

Donde sPAP: presión arterial pulmonar sistólica; dPAP: presión arterial pulmonar diastólica; sPAS: presión arterial sistémica sistólica; dPAS: presión arterial sistémica diastólica.

$$GC \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) : \frac{GC \text{ (L/min)} * 1000}{\text{peso corporal}}$$

$$RVP \left(\frac{\frac{\text{mmHg}}{\text{min}}}{\text{kg}} \right) : \frac{mPAP}{GC}$$

$$RVS \left(\frac{\frac{\text{mmHg}}{\text{min}}}{\text{kg}} \right) : \frac{mPAS}{GC}$$

Todas las variables in vivo se determinaron diariamente entre 9:00-11:00 AM y 9:00-10:00 PM durante el tratamiento, y luego en las mañanas (9:00-11:00 AM) desde el día 9 al 29 de vida (González-Candia y cols, 2020).

Protocolo de Infusión

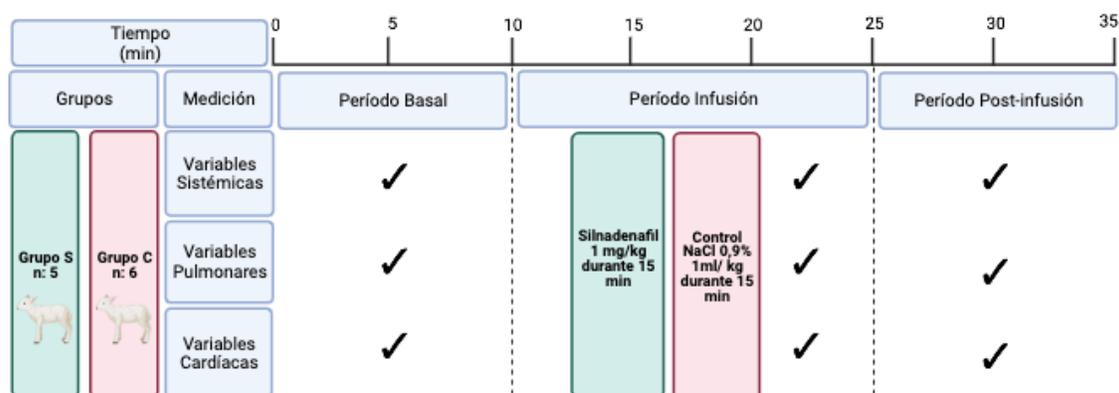


Figura 6. Protocolo de infusión in vivo. Esquema del protocolo experimental de infusión de sildenafil (S, n=5) y solución salina (C, n=6), realizado cada 12 horas durante 5 días de tratamiento.

Determinaciones *ex vivo* e *in vitro*

Al finalizar el período experimental (30 días edad), los corderos fueron eutanasiados con una sobredosis de Tiopental sódico (100 mg/kg vía endovenoso lento), para la colección de tejido pulmonar y su posterior análisis *ex vivo* e *in vitro*.

Miografía de alambre. El pulmón derecho fue disecado de manera de obtener arterias pulmonares pequeñas de 3^{er} y 4^{to} orden. De estas, se obtuvieron segmentos de 2mm de largo que fueron montados en un miógrafo de alambre, mantenido a 37°C y burbujeados con 95% O₂ - 5% CO₂. Las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras se evaluaron a través de curvas de respuesta a concentración-acumulativa (CRC) a Potasio (K⁺; 4,72-125 mM), Serotonina (5Ht; 10⁻¹⁰-10⁻⁴), Metacolina (MetCh; 10⁻¹⁰-10⁻⁴) y Nitroprusiato de sodio (SNP; 10⁻¹⁰-10⁻⁴) (Torres y cols, 2015). Para las curvas vasodilatadoras (MetCh y SNP), se pre-contrajo con 5Ht 10⁻⁶. Entre curvas se esperó al menos 30 minutos para asegurar un buen reposo de las arterias (Herrera et al, 2007; Herrera et al 2008).

Expresión de proteínas en tejido pulmonar. Se determinó la expresión proteica de PDE-5, eNOS, sGC y PKG en homogenizado de pulmón derecho, mediante Western

Blot. El tejido disecado fue tratado con tampón de lisis, para degradarlo mecánicamente, liberando las proteínas. Luego de realizada la electroforesis en gel; método que permite separar las proteínas bajo un campo eléctrico, de acuerdo a su movilidad electroforética, los lisados proteicos se cargaron en diferentes carriles del gel, al cual se le aplicó un campo eléctrico para desplazar las proteínas hacia el polo positivo. Luego de la migración de las proteínas en el gel, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana fue incubada con el anticuerpo primario de interés y luego el secundario (Tabla 2) para revelarlo por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution, Pierce) y posteriormente capturado por un scanner (Odyssey Imaging system, Li-Cor Biosciences). Finalmente, las fotografías fueron analizadas densitométricamente a través del programa Image J (Torres y cols, 2015).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados y condiciones experimentales para WB

Nombre	Tipo	Peso Molecular	Marca	Nº de catálogo	Concentración
Anti-eNOS	Policlonal	140 KDa	BD Transduction Laboratories	610296	1:1000
Anti-PDE-5	Policlonal	120 KDa	BD Transduction Laboratories	BD 611498	1:1000
Anti-sGCa	Policlonal	72 KDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-376502	1:1000
Anti-sGCb	Policlonal	65 KDa	Santa Cruz Biotechnology	Sc-514183	1:1000
Anti-PKG	Policlonal	75 KDa	Enzo Life Sciences	ADI-KAP- PK005	1:1000
B-actina	Policlonal	42 KDa	Thermo Fisher Scientific	AC-15	1:5000

Histología: El pulmón izquierdo fue perfundido con solución salina y paraformaldehído (PAF) al 4%. Luego, fue cortado en cubos de 2x2 cm y sumergido en PAF 4% por 24 h a 4°C. Luego de eso, el tejido fue lavado e incluido en parafina y cortado en láminas seriadas de 5 μm de espesor y procesado con tinción Van Gieson para un análisis vascular morfométrico. Las imágenes fueron capturadas a 100x y 400x. Con las microfotografías se determinó: diámetro interno (DI), diámetro externo (DE), % área luminal, espesor de pared muscular, % área muscular, espesor de adventicia, % área adventicia. Las características morfoestructurales de las arterias pulmonares fueron determinadas mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (Herrera y cols, 2008; Torres y cols, 2015; Astorga y cols, 2018), que permitió obtener las diferentes dimensiones mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Espesor muscular } (\mu\text{m}): \frac{\text{Diámetro muscular externo} - \text{Diámetro interno}}{2}$$

$$\text{Espesor Adventicia } (\mu\text{m}): \frac{\text{Diámetro total vascular} - \text{Diámetro muscular externo}}{2}$$

$$\text{Espesor de pared vascular } (\mu\text{m}): \text{Espesor capa muscular} \\ + \text{espesor capa adventicia}$$

$$\text{Área Luminal } (\%): \left(\text{Área} \frac{\text{luminal}}{\text{total}} \right) \times 100$$

$$\text{Área Muscular } (\%): \left(\text{Área} \frac{\text{muscular}}{\text{pared vascular}} \right) \times 100$$

$$\text{Área Adventicia } (\%): \left(\text{Área} \frac{\text{adventicia}}{\text{pared vascular}} \right) \times 100$$

Donde Área de pared vascular: área muscular + área adventicia

Análisis Estadístico

Todos los datos fueron expresados como promedio \pm ESM. Para la miografía de alambre la respuesta vascular a potasio fue analizada usando el análisis sigmoideal de Boltzmann, determinando la tensión máxima efectiva (Emax) y la concentración media máxima efectiva (EC50). Todas las otras curvas de respuesta a concentración (CRCs) fueron analizadas usando una ecuación de ajuste óptimo de respuesta-agonista. Los resultados fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía, no paramétrico) y la prueba de Dunn. Para las comparaciones intragrupo se utilizó la prueba de Friedman. Los resultados obtenidos mediante histomorfometría y expresión proteica fueron comparados con la prueba estadística de Mann Whitney. Las significancias estadísticas fueron aceptadas con $P \leq 0.05$ (Prism 5.0; GraphPad Software)(Torres y cols, 2015). Por razones éticas y seguir los principios de las 3 R's en la experimentación animal, se utilizó el menor número de animales posibles. El cálculo del tamaño muestral por grupo dio un $n=5$ (Charan & Kantharia, 2013). Además, estudios previos del laboratorio han sido capaces de determinar resultados fisiológicos y moleculares válidos y publicables con un n de 5-6 animales por grupo (Herrera y cols, 2008, Herrera y cols, 2010; Torres y cols, 2015; Gonzalez-Candia y cols, 2020).

Participación de la estudiante

Los procedimientos que fueron realizados por el equipo de investigación antes de que la alumna tesista se incorporara al Laboratorio corresponden a la generación de los animales, gestación y parto en tierras altas, administración de los fármacos, los experimentos *in vivo* y *ex vivo*, la eutanasia y recolección de muestras para su posterior análisis. Los procedimientos que realizó la alumna tesista fueron:

- Tabulación, procesamiento y análisis de los datos obtenidos en monitoreos *in vivo*.
- Tabulación, procesamiento y análisis de los datos obtenidos en las miografías de alambre *ex vivo*.
- Determinación de los niveles de proteínas asociadas a moléculas vasoactivas pulmonares por Western Blot.
- Procesamiento, obtención de microfotografías, mediciones y análisis de imágenes histológicas.
- Análisis estadístico, expresión y discusión de los resultados.
- Escritura de la Tesis.

RESULTADOS

Determinaciones *in vivo*

Los animales fueron pesados a diario y no se observaron diferencias entre ambos grupos, en sus pesos absolutos o ganancia diaria (Figura 7).

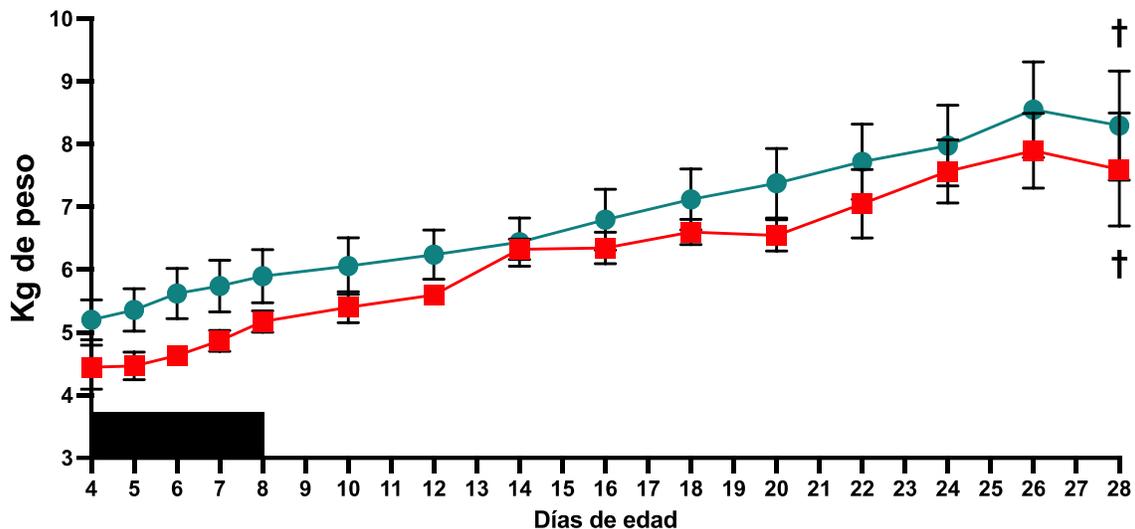


Figura 7. Promedio de pesos de neonatos de oveja. Grupos experimentales corresponden al control (C, n=6, símbolos rojos) y tratados con sildenafil (S, n=5, símbolos verdes). Barra negra muestra el período de tratamiento. Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): † día 4 vs día 28 (comparación intragrupo).

La administración diaria de sildenafil no generó diferencias sostenidas de la mPAP en los neonatos de oveja con respecto a los controles mientras duró el tratamiento. Respecto a las variables hemodinámicas pulmonares, el tratamiento con sildenafil no generó diferencias entre los grupos C y S. Ambos grupos mostraron comportamientos similares para valores en mPAS, RVS GC y FC, sin diferencias estadísticas entre ellos (Figuras 9-10). Se evidenció diferencias significativas intra grupo de los días 4 versus 28 para los valores de FC y GC.

Sin embargo, al evaluar el efecto agudo de la infusión, se pudo evidenciar que el uso de sildenafil disminuye la mPAP basal durante la infusión y la etapa post-infusión, lo que también se vio expresado en una caída de la RVP (Figura 11). En relación a los

efectos sistémicos, solo se evidenció una caída de la mPAS de manera aguda en la infusión de la mañana (AM), sin presentar cambios PM (Figura 12). A su vez, la infusión de sildenafil no tuvo efectos sobre la RVS (Figura 12) o cardíacos como FC y GC (Figura 13).

El análisis de los valores pulmonares, hemodinámicos sistémicos y cardíacos durante la infusión de vehículo (NaCl 0,90%) en el grupo control, no tuvo efectos, sin diferencias durante los periodos experimentales (basal, infusión y post-infusión) en todas las variables evaluadas (Figura 14).

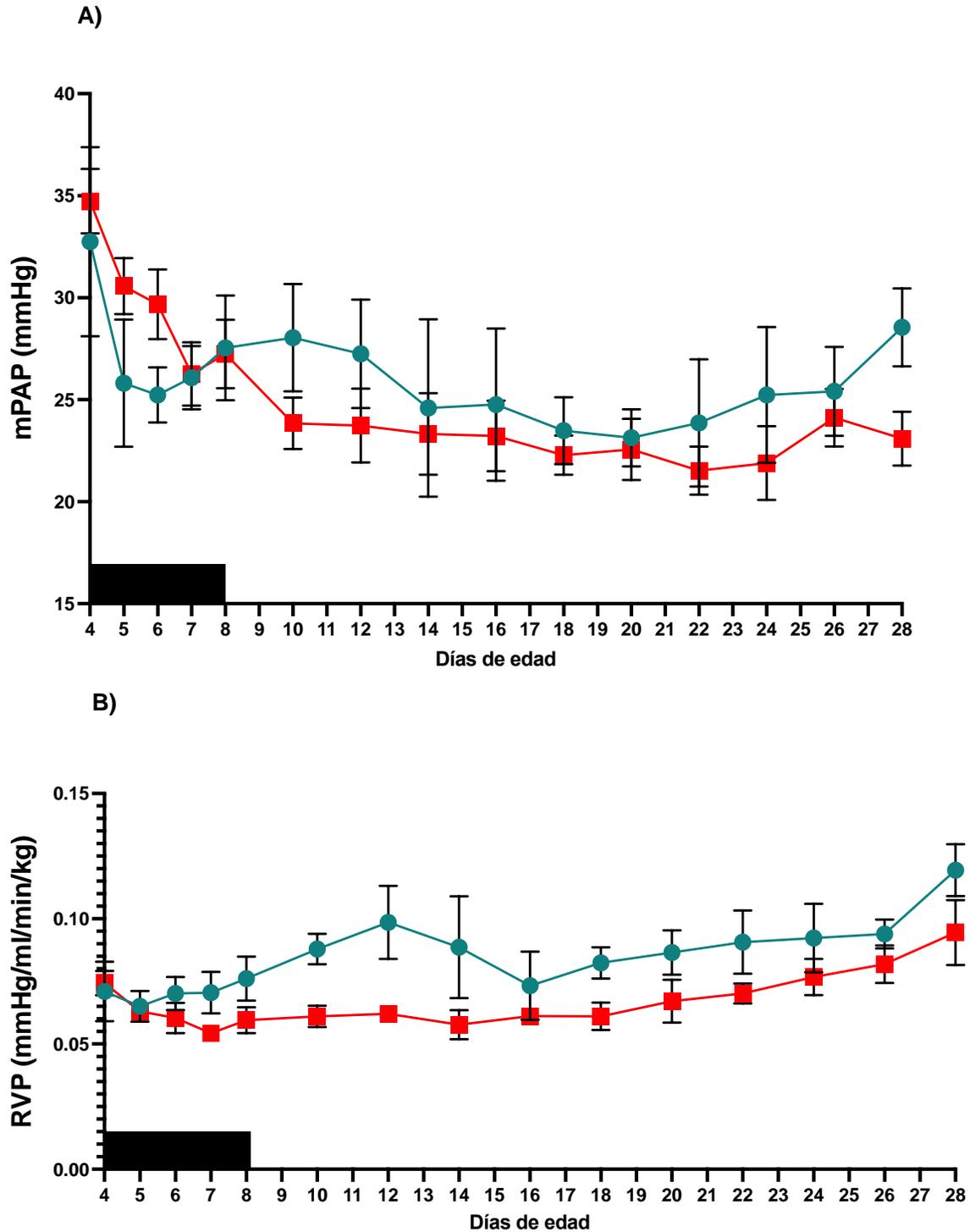


Figura 8. Variables hemodinámicas pulmonares. (A) Presión arterial pulmonar media (mPAP) y (B) Resistencia vascular pulmonar (RVP) durante el periodo experimental. Grupos experimentales corresponden al control (C, n=6, símbolos rojos) y tratados con sildenafil (S, n=5, símbolos verdes). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Barra negra muestra el período de tratamiento.

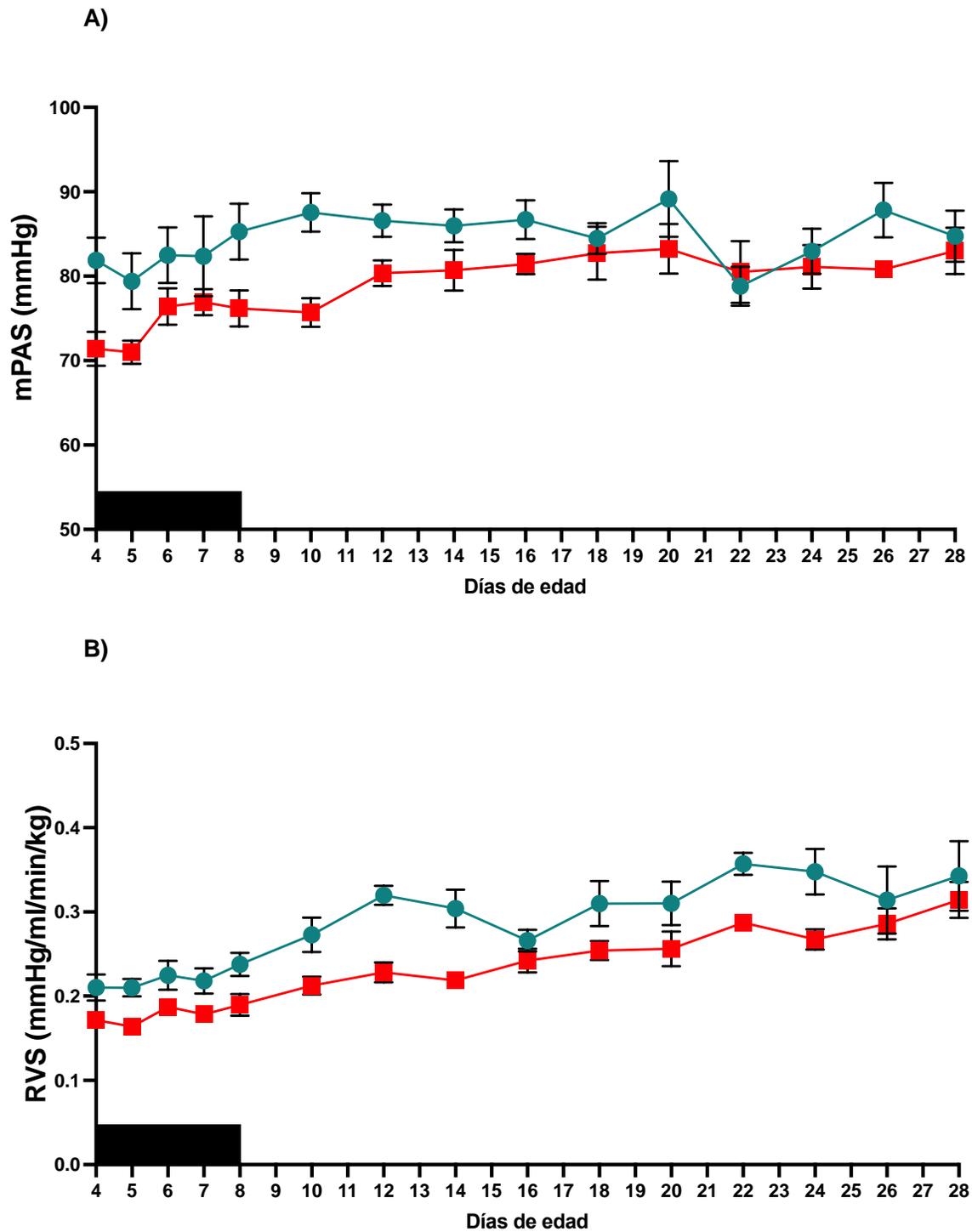


Figura 9. Variables hemodinámicas sistémicas. (A) Presión arterial sistémica media (mPAS) y (B) Resistencia vascular sistémica (RVS) durante el periodo experimental. Grupos experimentales corresponden al control (C, n=6, símbolos rojos) y tratados con sildenafil (S, n=5, símbolos verdes). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Barra negra muestra el período de tratamiento.

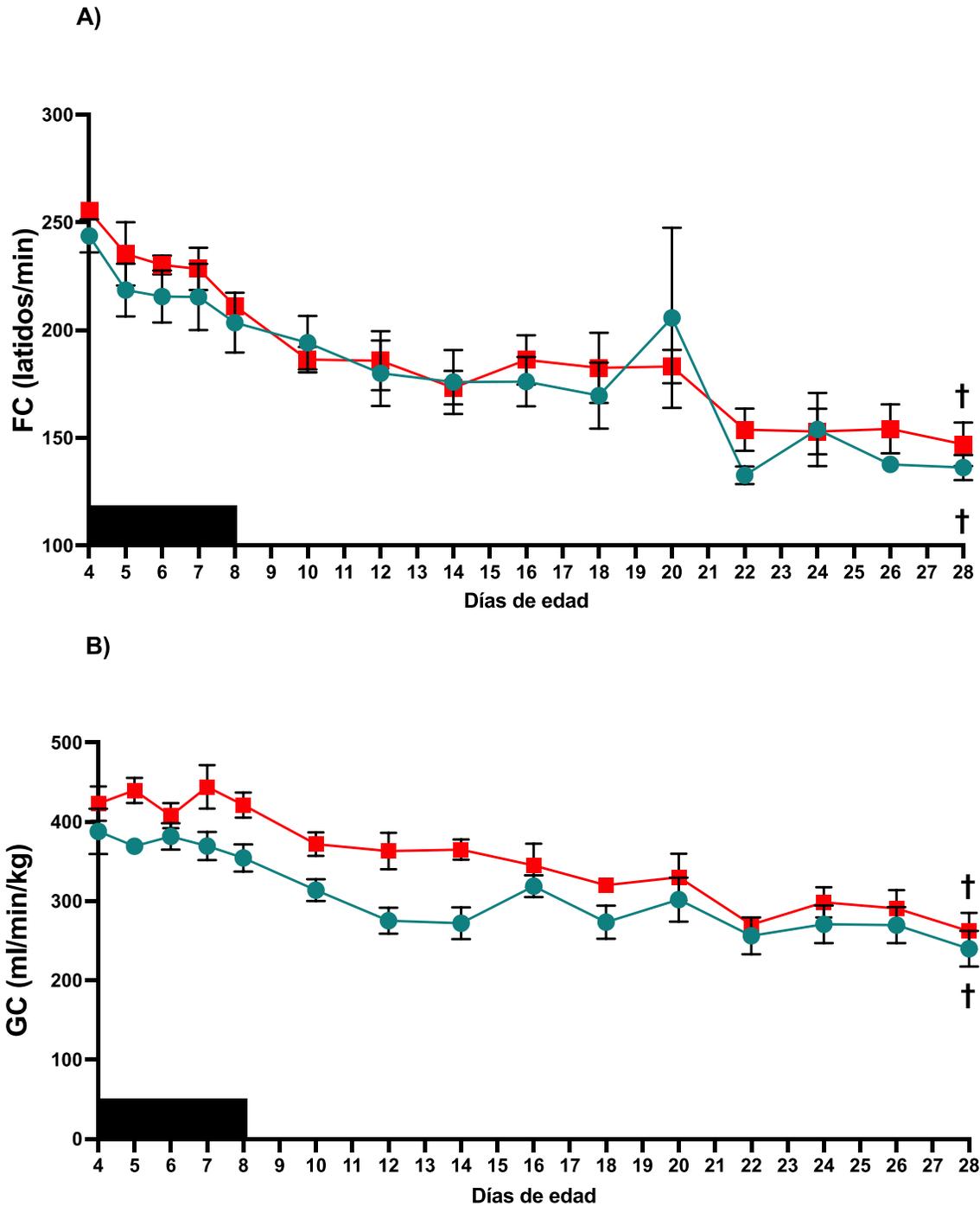


Figura 10. Variables cardíacas. (A) Frecuencia cardíaca (FC) y (B) Gasto cardíaco (GC) durante el periodo experimental. Grupos experimentales corresponden al control (C, n=6, símbolos rojos) y tratados con sildenafil (S, n=5, símbolos verdes). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Barra negra muestra el período de tratamiento. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): † día 4 vs día 28.

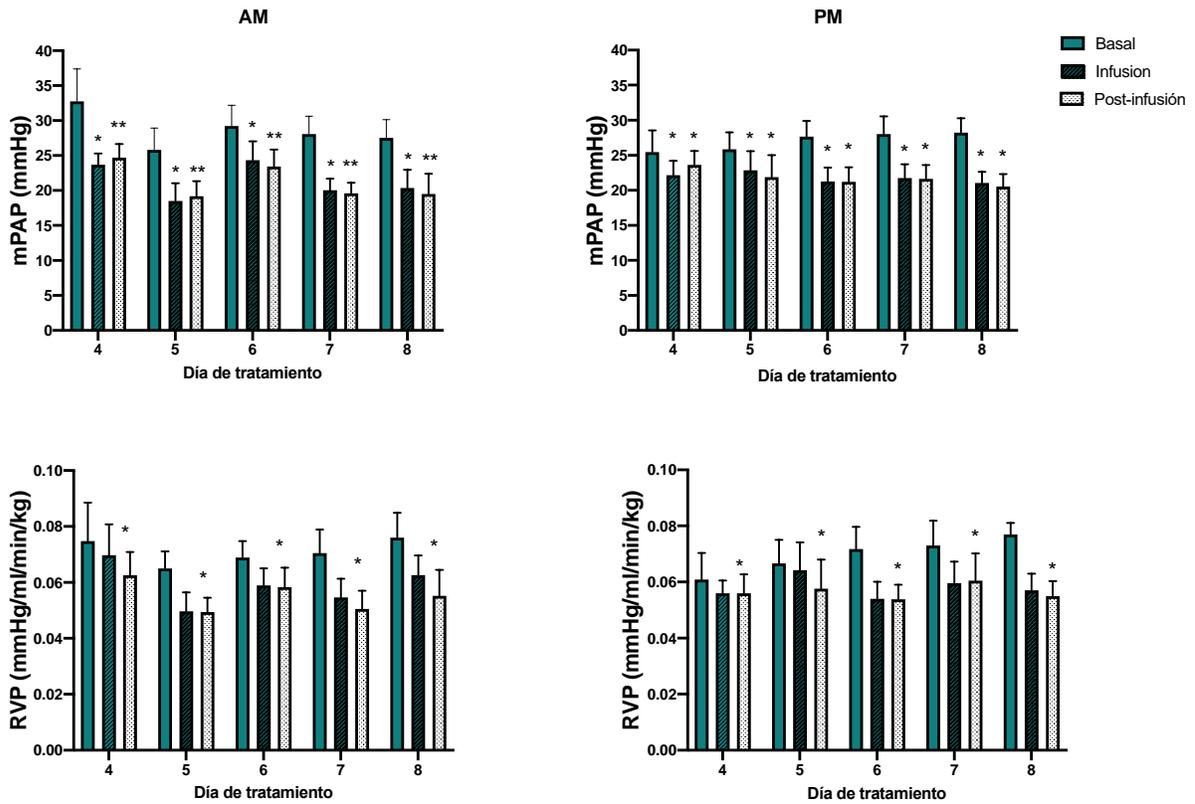


Figura 11. Valores hemodinámicos pulmonares durante la infusión de sildenafil. Se muestran los promedios de los períodos Basal, Infusión con sildenafil y Post-infusión. Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M, determinados durante la mañana (AM, n=5) y la tarde (PM, n=5). mPAP: Presión arterial pulmonar media; RVP: Resistencia vascular pulmonar. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): * vs basal del mismo día.

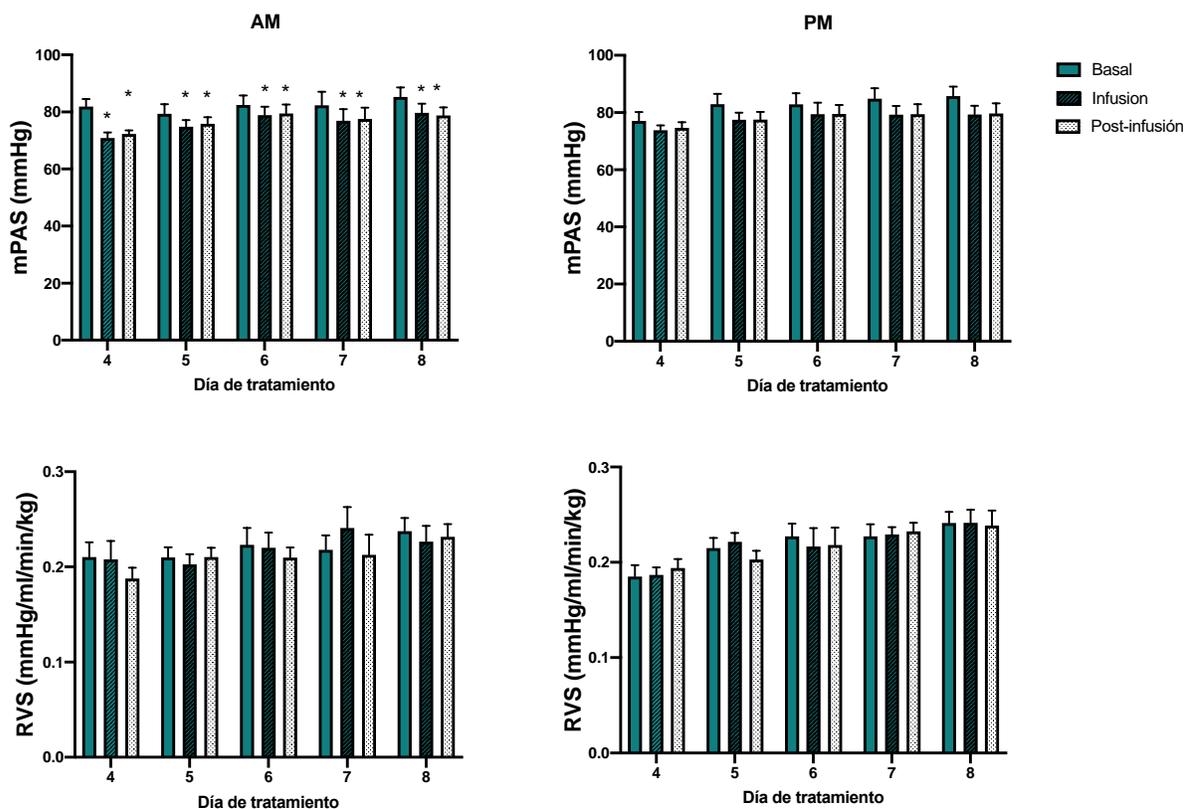


Figura 12. Valores hemodinámicos sistémicos durante la infusión de sildenafil. Se muestran los promedios de los períodos Basal, Infusión con sildenafil y Post-infusión. Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M, determinados durante la mañana (AM, n=5) y la tarde (PM, n=5). mPAS: Presión arterial sistémica media; RVS: Resistencia vascular sistémica. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): * vs basal del mismo día.

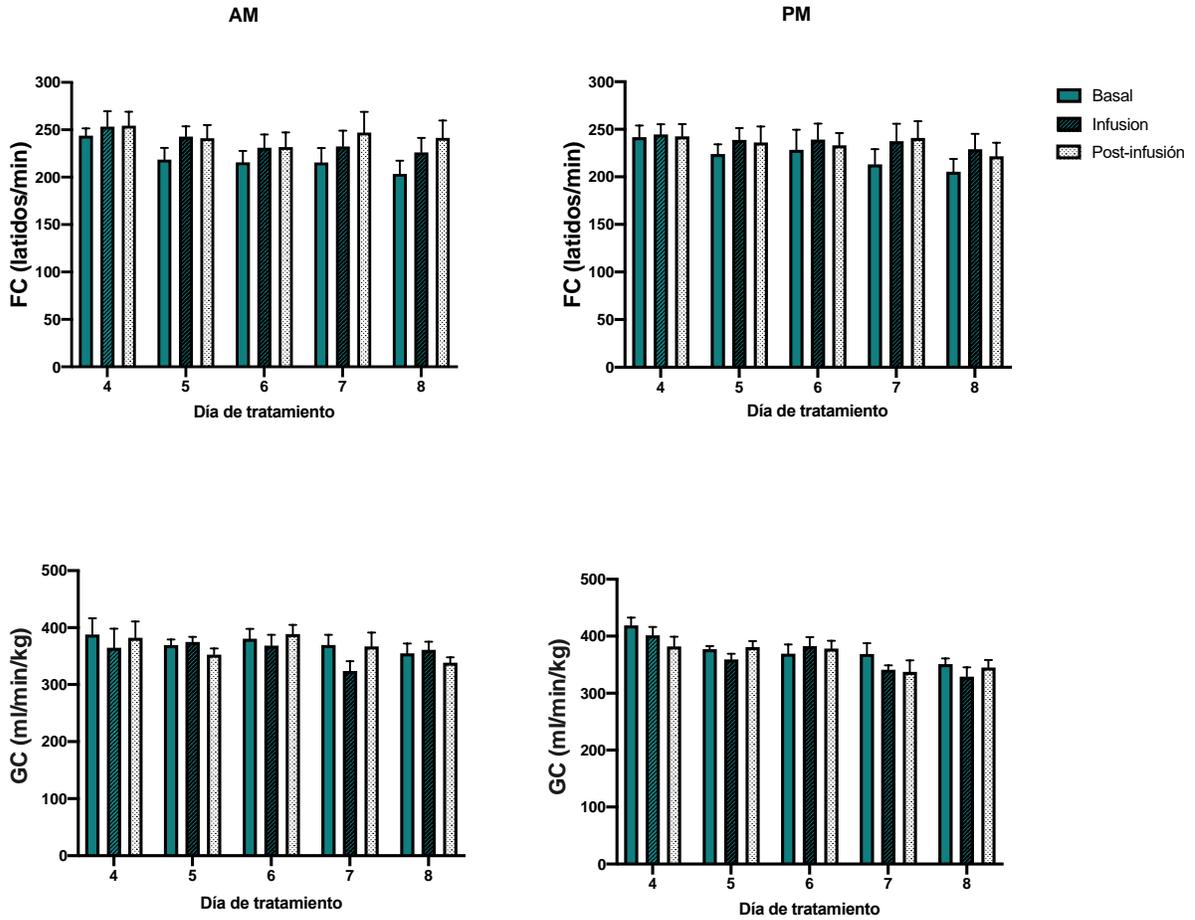


Figura 13. Valores cardíacos durante la infusión de sildenafil. Se muestran los promedios de los períodos Basal, Infusión con sildenafil y Post-infusión. Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M, determinados durante la mañana (AM, n=5) y la tarde (PM, n=5). GC: gasto cardíaco; FC: frecuencia cardíaca. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): * vs basal del mismo día.

Determinaciones *ex vivo*

La función vasoconstrictora de arterias pulmonares de resistencia fue determinada mediante dosis ascendentes de K⁺, Serotonina y Endotelina-1, donde pudo evidenciarse que ambos grupos presentaron una respuesta vasoconstrictora dosis dependiente (Figura 14). Al respecto, el grupo tratado con sildenafil presentó mayor respuesta máxima y sensibilidad a K⁺ (Figura 14A). Además, el tratamiento con sildenafil indujo una respuesta máxima mayor pero una sensibilidad menor a 5Ht con respecto al grupo control (Figura 14B). En contraste, el grupo sildenafil presentó una menor respuesta máxima a ET-1 en comparación con el grupo control (Figura 14C).

Para determinar la función vasodilatadora de las arterias pulmonares, se evaluó tanto una vía dependiente como independiente del endotelio, con metacolina y SNP respectivamente. Bajo este contexto, grupo sildenafil mostró tener una respuesta máxima y sensibilidad aumentada respecto al grupo control, tanto para MetCh (Figura 15A) como para SNP (Figura 15B).

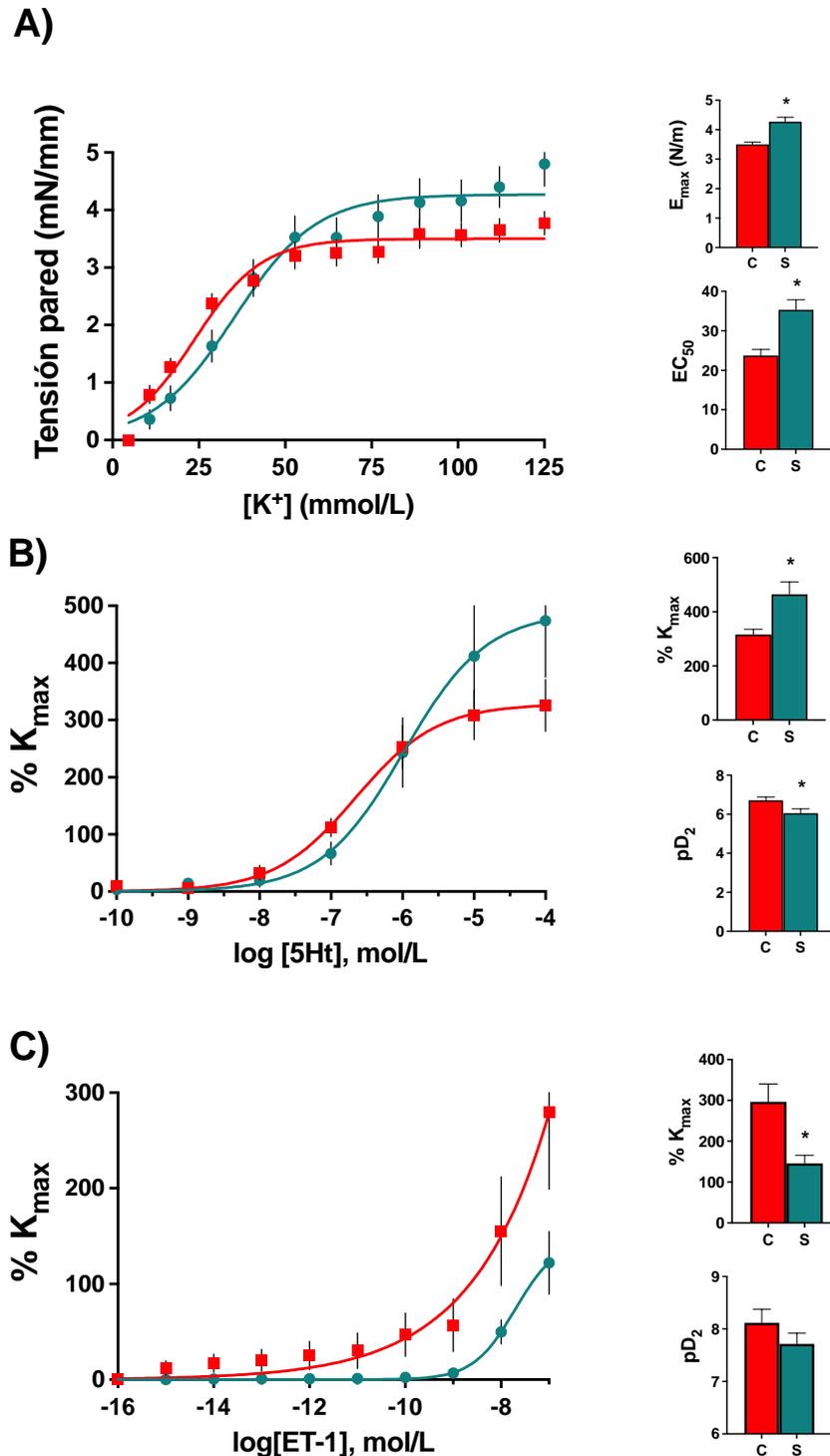


Figura 14. Respuesta vasoconstrictora de arterias pequeñas pulmonares. Curva dosis respuesta de (A) KCl, de (B) Serotonina y de (C) Endotelina-1. Los histogramas insertos muestran la respuesta máxima (E_{max} o K_{max}) y la sensibilidad (EC_{50} o pD_2). Los grupos son control (C, símbolos rojos, $n=6$), y tratado con sildenafil (S, símbolos verdes, $n=5$). Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía y la prueba de Dunn. Los resultados se expresaron como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$): * vs C.

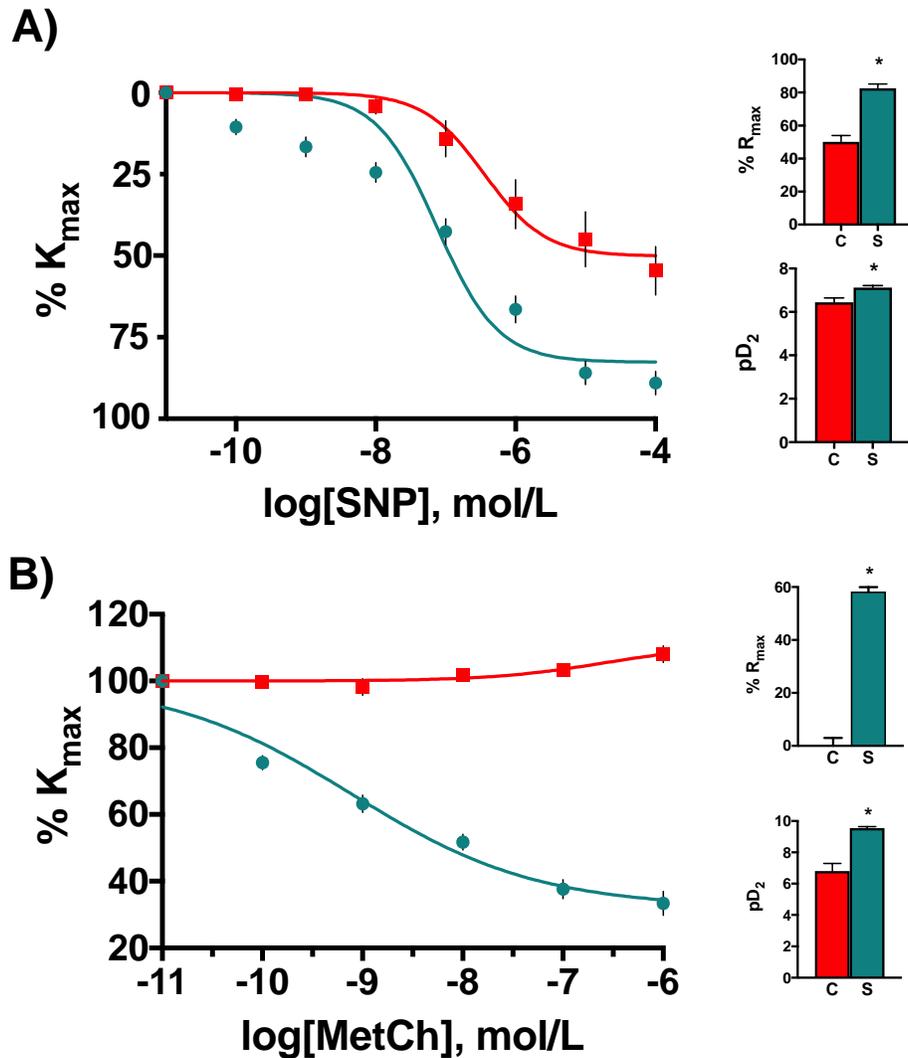


Figura 15. Respuesta vasodilatadora de arterias pequeñas pulmonares. Curva dosis respuesta de (A) Nitroprusiato de sodio y (B) Metacolina. Los histogramas insertos muestran la respuesta máxima (R_{max}) y la sensibilidad (pD₂). Los grupos son control (C, símbolo rojo, n=6), y tratado con sildenafil (S, símbolo verde, n=5). Se efectuó un análisis de varianza ANOVA de una vía y la prueba de Dunn. Los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Diferencias significativas (p≤0,05): * vs C.

Determinaciones *in vitro*

Para el análisis de expresión proteica, se cuantificó expresión de eNOS, GC α , GC β y PKG en tejido pulmonar, las que no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y grupo sildenafil (Figura 16). Sin embargo, la cuantificación de PDE-5 demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

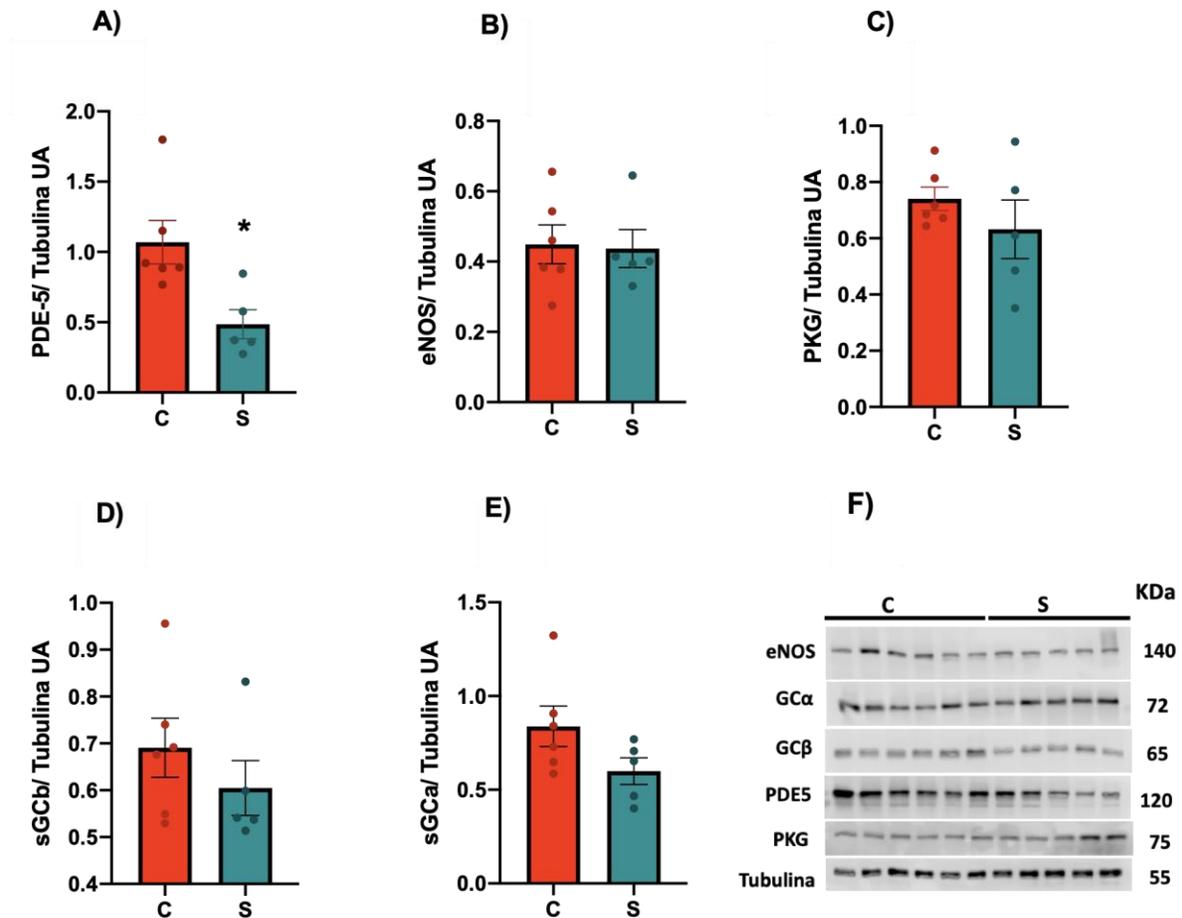


Figura 16. Expresión de proteínas de la vía eNOS-PDE5-PKG. Expresión proteica de (A) eNOS, (B) sGC α , (C) sGC β , (D)PDE-5, (E) PKG y (F) Imagen representativa de los Westerns blots. Los grupos son control (C, barra roja, n=6), y tratado con sildenafil (S, barra verde, n=5). Se efectuó la prueba de U Mann-Whitney. Los resultados se expresaron como promedio \pm ESM.

El análisis histo-morfológico de las arterias pulmonares pequeñas demostró que el grupo tratado con sildenafil tuvo un diámetro interno (Figura 17A), área luminal (17D) y área muscular (17F) significativamente menor que el grupo control, manteniendo el área de pared vascular (Figura 17E) similar entre ambos grupos. Consistentemente, el área adventicia fue significativamente mayor en este grupo (Figura 17G), conservando diámetros totales vasculares similares entre ambos grupos.

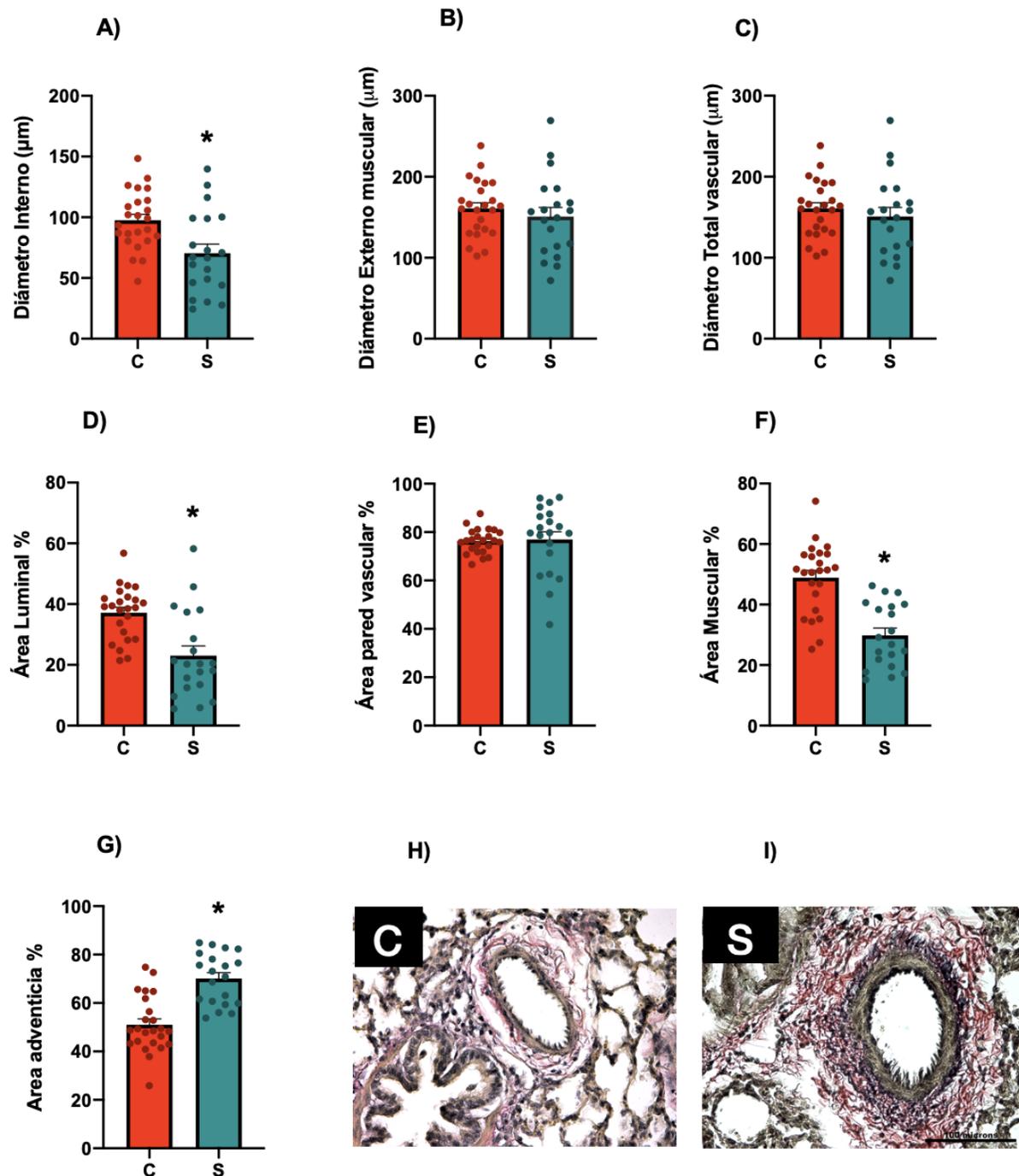


Figura 17. Histo-morfometría de arterias de resistencia de tejido pulmonar. (A) Diámetro interno, (B) Diámetro externo muscular, (C) Diámetro total vascular, (D) % Área luminal, (E) % Área pared vascular; (F) % Área Muscular; (G) Área adventicia. Se muestran figuras representativas de los grupos son control (C, barra roja, n=6), y tratado con sildenafil (S, barra verde, n=5) en H e I, respectivamente. Barra micrométrica: 100 μm. Se efectuó la prueba de U Mann-Whitney. Los resultados se expresaron como promedio ± ESM. Diferencias significativas (p<0,05): * vs C.

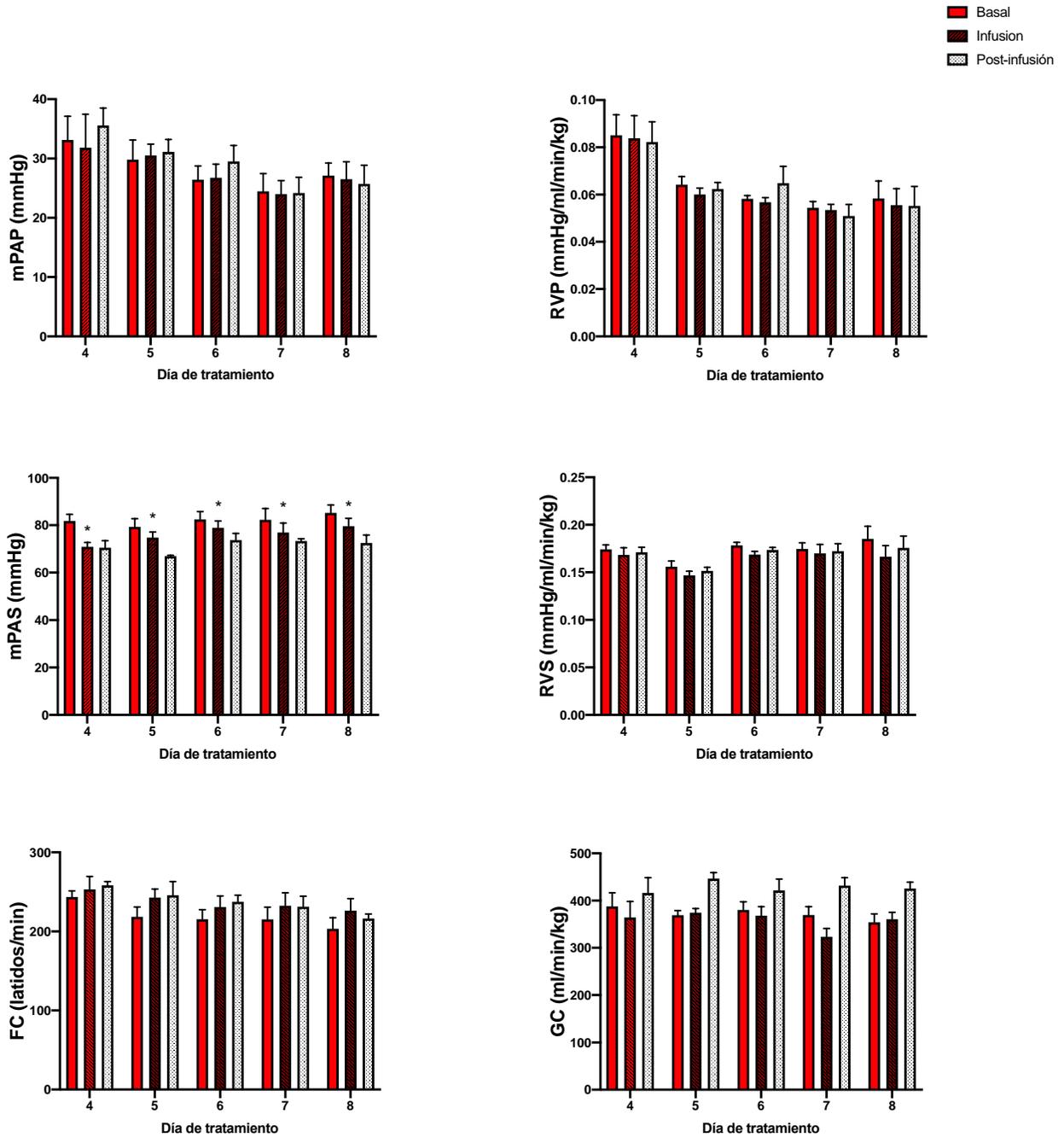


Figura 14. Valores hemodinámicos pulmonares, sistémicos y cardíacos durante la infusión de vehículo en el grupo Control. Se muestran los promedios de los períodos Basal, Infusión con NaCl 0,9% y Post-infusión. Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M, determinados durante la mañana (AM, n=6). mPAP: Presión arterial pulmonar media; RVP: Resistencia vascular pulmonar; mPAS: Presión arterial sistémica media; RVS: Resistencia vascular sistémica; GC: gasto cardíaco; FC: frecuencia cardíaca.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de sildenafil, un inhibidor de la PDE-5, en neonatos de oveja sometidos a hipoxia crónica de altura, evaluando su rol en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar neonatal.

En esta tesis demostramos que el uso de sildenafil en neonatos de oveja no induce diferencias permanentes significativas en las variables cardiopulmonares *in vivo* de la evaluación del tratamiento evaluado a largo plazo, como mPAP, RVP, mPAS y RVS. Por esta razón, no se evidenciaron cambios clínicamente relevantes al comparar el grupo tratado con su control al día 28. Sin embargo, hubo diferencias significativas al contrastar estas variables durante la infusión (diferencia entre las mediciones basal-infusión y basal post-infusión para mPAP, RVP y mPAS), pero estos efectos no se mantuvieron en el tiempo. Esto indica que sildenafil generó una disminución aguda de las variables cardiopulmonares, mPAP y RVP, principalmente por su efecto vasodilatador pulmonar ya descrito (Herrera y cols, 2008). Esto ocurrió en presencia de una pequeña baja de la mPAS solo durante la infusión de la mañana, sin modificaciones en la RVS. De hecho, la mPAS se mantuvo en valores fisiológicos (Herrera et al, 2007), por lo que no lo consideramos como efecto adverso hemodinámico sistémico (ej. Hipotensión sistémica), tal como lo han visto otros autores (Mikhail y cols, 2004; Shekerdemian y cols, 2002). Al contrastar estos resultados de efecto agudo de la infusión de sildenafil con el grupo control, se pudo evidenciar que efectivamente el efecto vasodilatador está presente a nivel pulmonar en el grupo S. A su vez, la administración de sildenafil mejoró significativamente la función *ex vivo* de arterias pulmonares de resistencia, pero sin cambios en la expresión de proteínas asociadas a la vía oxido-nitrérgica. Además, los estudios *in vitro* demostraron cambios histomorfológicos significativos, con una pared vascular de similares características en ambos grupos, pero con diferencias significativas en el área luminal y adventicia. Algunos de los resultados coinciden con nuestra hipótesis inicial, pero algunos son opuestos a ella.

Respecto a las variables hemodinámicas, llama la atención la falta de respuesta vasodilatadora pulmonar al finalizar la monitorización pues previamente ha sido demostrada la efectividad de sildenafil como vasodilatador pulmonar (Thompson y cols, 2019; Herrera y cols, 2008). De hecho, ambos estudios previamente citados demostraron una disminución de la mPAP sin efectos deletéreos en mPAS, donde la inhibición de la PDE-5 por sildenafil generó una vasodilatación mediada por el aumento del cGMP. Esta ausencia de efecto vasodilatador a nivel crónico puede deberse principalmente a que el fármaco ejerce su función solo mientras se está administrando, lo cual observamos en el presente estudio, sin generar un efecto acumulativo ni permanente en el tiempo. De hecho, la administración aguda de sildenafil produjo un efecto vasodilatador pulmonar al comparar las variables de mPAP al momento de la infusión y post-infusión con respecto al valor basal, pero que no persistió hasta la siguiente dosificación, 12 horas después, lo cual se pudo observar mediante la comparación de las variables en la etapa post-infusión luego de la administración de sildenafil en la mañana y medición basal realizada durante la tarde. Esto nos indica que la posología utilizada en esta tesis podría haber sido un limitante frente a la falta de resultados clínicos significativos, lo que podría ser modificada en futuras investigaciones, ya que puede ser administrada en intervalos de 6 horas también, sin exceder los 2 mg/kg (Dhariwal y Bavdekar, 2015). Respecto de la farmacocinética y farmacodinamia de sildenafil en neonatos, Mukherjee y cols (2008) describieron un modelo de dos compartimientos, con un volumen de distribución 4 veces más alto que en adultos, resultando en una vida media más prolongada, lo cual, según otros autores se iría modificando a medida que aumenta la edad postnatal, a causa de la maduración hepática con el paso de los días y el aumento del *clearance* por la maduración renal (Dhariwal y Bavdekar, 2015). Luego de una dosis de carga seguido por una infusión endovenosa, Cochius y cols (2020) describieron un *peak* plasmático terapéutico de sildenafil 1 hora después de comenzada la infusión. Por esta razón, se estima que una posible alternativa es la realización de estudios de administración continua de la droga con monitorización hemodinámica permanente. Además, sildenafil no generó disminución de la mPAS comparativa con el grupo control según lo reportado por diversos autores como uno de los mayores efectos adversos (Dhariwal y Bavdekar,

2015; Feldman y cols, 2010; Lakshminrusimha y cols, 2016; Luecke y McPherson, 2017; Martinho y cols, 2020; Milger y cols, 2015). Por lo tanto, el tratamiento administrado en esta Tesis podría ser más efectivo bajo un régimen de administración mas frecuente (c/6 horas) o incluso de manera continua.

Durante la transición desde la vida fetal a la neonatal, el pulmón debe realizar complejos cambios fisiológicos a tan solo minutos de nacer, donde el líquido pulmonar debe ser aclarado rápidamente para permitir la entrada de aire y comenzar el intercambio gaseoso al momento de nacer (Gupta y Paria, 2019; Morton y Brodsky, 2016). Este proceso es de vital importancia también para la transición cardiovascular, ya que los 4 *shunts* de la circulación fetal (ductus arterioso, vasos umbilicales, ductus venoso y foramen oval), debiesen ocluirse al nacer, llevando a un aumento de la resistencia vascular sistémica. El cierre del ductus arterioso depende en gran medida del aumento de oxígeno por lo que este proceso se ve disminuido en neonatos hipóxicos (Gupta y Paria, 2019). Estudios previos del Laboratorio han demostrado efectivamente que este proceso se enlentece en los recién nacidos de oveja a 3600 m, los que mantienen un ductus arterioso (DA) permeable con altas presiones y resistencias arteriales pulmonares, incluso hasta el día 9 después del nacimiento (Alegría, 2018). Por esta razón y asociando nuestros resultados in vivo, sería interesante plantear un protocolo de administración de sildenafil hasta el cierre funcional del DA. Este cierre se puede comprobar y controlar diariamente de manera no invasiva por ecocardiografía Doppler (Alegría, 2018).

La respuesta funcional de las arterias pequeñas de resistencia pulmonares *ex vivo*, demostró que tanto el grupo control como sildenafil obtuvieron una respuesta contráctil frente a la administración de K^+ , 5HT y ET-1. La respuesta máxima de contracción a K^+ fue significativamente mayor en el grupo sildenafil, lo cual es opuesto a lo esperado por nuestra hipótesis. Esto podría deberse al mayor espesor de la pared muscular o mejor función de las CML, que está asociado a una mayor capacidad contráctil (Herrera y cols, 2007). La función de CML ha sido asociada a una mayor actividad voltaje dependiente de canales de Ca^{2+} o un aumento a la sensibilidad de éste en las células musculares lisas (González-Candía y cols, 2020). Esta última opción es

probable en las arterias estudiadas, ya que la cantidad de músculo liso, expresada como espesor y diámetro externo muscular fueron similares entre ambos grupos. Sin embargo, los estudios de esta Tesis no son capaces de definir los mecanismos involucrados en la sensibilidad a Ca^{2+} .

La respuesta máxima de contracción a 5Ht también fue significativamente más alta en el grupo sildenafil, pero con menor sensibilidad. Una posible explicación de esto, es que los receptores 5Ht se vean alterados por el tratamiento vasodilatador con sildenafil (Rivera Rosales, 2004). Futuros estudios debiesen enfocarse en la expresión y actividad de estos receptores para dilucidar el mecanismo determinante y predominante de esta respuesta. De hecho, tanto la disminución de receptores como la hipoxia crónica podrían aumentar de manera compensatoria la expresión de vías serotoninérgicas (Rivera Rosales, 2004).

Por otro lado, y a diferencia de lo ocurrido con 5Ht, la respuesta contráctil máxima a endotelina-1 fue significativamente menor en el grupo tratado con sildenafil. Esto fue un hallazgo positivo al tratamiento y podría deberse a la recuperación de la función endotelial evidenciada por los estudios miográficos. De hecho, el daño endotelial es una de las causas más frecuentes de aumento de síntesis y liberación de ET-1 (Rivera Rosales, 2004). Es más, el uso combinado de sildenafil y NOi ha disminuido los niveles de ET-1 plasmática en niños con HAPN (Li y cols, 2009).

ET-1 es el vasoconstrictor más potente conocido, altamente expresado en pulmón (5 veces más que en otros órganos)(Chester y Yacoub, 2014) produciendo vasoconstricción intensa a bajas concentraciones. Además, ET-1 determina la proliferación de células de la musculatura lisa pulmonar, donde en diversos estudios se ha visto que el bloqueo de este receptor, ha atenuado la hipertensión arterial pulmonar y disminuido la hipertrofia muscular lisa (Distefano y Sciacca, 2015). Los niveles séricos de ET-1 en recién nacidos con HAPN son más altos comparados con recién nacidos sanos, considerándose un parámetro que permite evaluar la severidad de la patología y la disminución sérica de estos, considerarse un progreso en la recuperación (Endo y cols, 2001). De acuerdo a todo lo anterior, el tratamiento con sildenafil pudo disminuir el efecto vasoconstrictor de ET-1 en pulmón, lo cual es un

importante hallazgo. En particular, se ha descrito que en HAPN, los receptores tipo A juegan un rol en el aumento del tono vasoconstrictor, sugiriendo también una reducción en la actividad de los receptores tipo B, tal como lo descrito por Dupuis y Hoepfer (2008), quienes indican una relación $ET_a:ET_b$ de 30:70 en tejido pulmonar sano. Los receptores ET_a , localizados principalmente en la musculatura lisa, son los responsables de la actividad vasoconstrictora, mientras que la mayor proporción de receptores ET_b se ubican en las células endoteliales, siendo responsables de la vasodilatación (Heymann, 1999). Por lo tanto, nuestros hallazgos podrían ser mediados por una disminución de la expresión o activación de los receptores ET_a o un aumento de sus receptores ET_b . El mecanismo específico de esta respuesta debe ser investigado en futuros estudios pues es uno de los aspectos más beneficiosos del tratamiento con sildenafil.

El estudio de relajación independiente de endotelio, a través de la administración de SNP evidenció una respuesta vasodilatadora en ambos grupos, siendo significativamente mayor y más sensible en el grupo sildenafil. Esto demuestra que adicionar un precursor de NO, actúa generando liberación de este mismo hacia la CML. Esto genera mayor biodisponibilidad de cGMP, activando proteína quinasa G tipo 1 (PKG1) y disminuyendo la concentración de calcio intracelular, provocando una relajación del músculo liso (Beñaldo y cols, 2017; Cabral y Belik, 2013; Dakshinamurti, 2005; Storme, 2013). Este hallazgo demuestra que sildenafil mejora y revierte la disfunción vasodilatadora dependiente de músculo liso (Balarini y cols 2013; Schwartz y cols, 2013), lo cual se condice con el hallazgo histomorfológico al tener ambos grupos similar espesor de pared vascular. A la vez, el grupo sildenafil presentó una mayor sensibilidad y respuesta máxima a metacolina, un inductor de vasorelajación dependiente de endotelio. Este resultado es aún más relevante considerando que el grupo control no presentó respuesta vasodilatadora a metacolina, evidenciando la existencia de una marcada disfunción vascular. Esta es una demostración categórica de que la disfunción endotelial es una patología presente en estos neonatos de oveja expuestos a hipoxia crónica; y que sildenafil pudo recuperar dicha función (Herrera y cols, 2007; Torres y cols, 2015). A nuestro entender, esta respuesta es la más importante de este estudio, que demuestra una clara mejora en la función

vasodilatadora endotelial, vía eNOS, PGI2 o del Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (Torres y cols, 2015). La metacolina es un agonista colinérgico (análogo de acetilcolina) el cual actúa uniéndose y activando receptores muscarínicos, por lo que su función es dependiente de un endotelio funcional, permitiendo la liberación de NO (Barreto y cols, 2003). Los mecanismos que determinan esta mayor respuesta vasodilatadora en el grupo sildenafil, se basan principalmente en las características funcionales de las células endoteliales, pero aun desconocemos cuales serían las vías endoteliales recuperadas.

Los hallazgos de histología mostraron una respuesta paradójica para el grupo sildenafil, pues presentaron una disminución del lumen, con similares espesores de pared vascular y muscular. Esto representa un remodelado concéntrico hipertrófico de las arterias (Mulvany, 2012), según nuestros hallazgos, dependiente de un aumento de la capa adventicia. Contradictorio a muchos estudios, un tratamiento vasodilatador debiese revertir este tipo de remodelamiento inducido por aumento de presión intravascular (Mulvany, 2012). Para explicar esta paradoja, especulamos que luego de terminar con el tratamiento de sildenafil (día 8 post natal), existe un efecto rebote inducido por la hipoxia crónica y la ausencia del vasodilatador pulmonar. Con esto, durante los 25 días posteriores al término del tratamiento es posible que se volvieran a activar mecanismos de remodelamiento arterial pulmonar (Herrera y cols, 2007; Llanos y cols, 2011; Sharma y Lakshminrusimha, 2015; Stenmark y cols, 2006; Teixeira-Mendonça y Henriques-Coelho, 2013; Zhao y cols, 2001). Uno de los mecanismos que producen estos cambios histológicos es la liberación de factores tróficos como HIF y NFκB, los cuales están mediados por hipoxia crónica, pudiendo llegar niveles hasta 13 veces más altos en tejido pulmonar (Liu y cols, 2019; Patel y cols, 2017). Además, la proliferación de fibroblastos hacia miofibroblastos en la capa adventicia y cambios transicionales de las células endoteliales hacia mesenquimales, contribuyen al engrosamiento de la vasculatura, como también una excesiva acumulación de matriz extracelular, como colágeno, elastina, fibronectina y tenascina (Stenmark y cols, 2006).

El análisis de expresión de proteínas no evidencia diferencias entre los grupos experimentales eNOS, GCs α , GCs β y PKG lo cual podría asociarse a que estamos evaluando la vía canónica eNOS-sGC-PKG, la cual es la más importante en la vasodilatación pulmonar, pero no la única (Martinho y cols, 2020), teniendo en cuenta que para que el proceso de vasodilatación ocurra es necesario una disminución de los niveles citosólicos de calcio y un aumento en la actividad e la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLCP). Sin embargo, PDE-5 tuvo una disminución estadísticamente significativa en el grupo sildenafil, lo cual nos indica que los neonatos bajo tratamiento tienen una menor degradación de GMPc. Esto deriva en una vasodilatación más marcada, lo que se pudo comprobar en las arterias pequeñas de resistencia sometidas a metacolina en las miografías de alambre. Otra vía no evaluada en esta Tesis asociada a la acción de sildenafil, podrían ser componentes río abajo de esta cascada de señalización, u otras vías vasodilatadoras como PGI₂ y EDHF (Martinho y cols, 2020; Poitras y cols, 2020; Zhao y cols, 2001). Además, sildenafil podría modular negativamente vías vasoconstrictoras como ET-1 (Liu y cols, 2018), expresiones que no fueron determinadas en esta Tesis, pero que si demostraron una disminuida respuesta en el estudio *ex vivo*.

Es importante recordar que la fisiología circulatoria pulmonar difiere de la sistémica, manteniendo un mecanismo homeostático intrínseco, donde se produce una respuesta importante frente a disminuciones de la presión de oxígeno alveolar, lo que se conoce como vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) y que consiste en la contracción reversible de la musculatura lisa de pequeños vasos, optimizando la relación ventilación-perfusión (West, 2016). Es por ello, que la altura es un estímulo potente para generar vasoconstricción pulmonar hipóxica, donde mediarán sustancias vasoactivas, generadas tanto por el endotelio como por el músculo liso vascular (Chester y Yacoub, 2014; Endo y cols, 2000; Endo y cols, 2001). Los hallazgos clínicos de nuestro estudio indican que la dosis y ventana terapéutica de sildenafil, evaluadas en esta Tesis, son incapaces de contrarrestar los intensos efectos vasoconstrictores de la hipoxia crónica en el territorio pulmonar neonatal. Por lo tanto, especulamos que

este tratamiento asociado a oxigenoterapia, como ocurre en situaciones clínicas (Jain & McNamara, 2015), podría tener una efectividad mayor.

La fosfodiesterasa 5 es un regulador clave en la reactividad vascular pulmonar de los recién nacidos (Martinho y cols, 2020). Existen 11 isoformas de fosfodiesterasas, donde PDE-5 está altamente expresada en el pulmón de neonatos. Desde el año 2012, la FDA notificó que no recomienda el uso de sildenafil en niños, debido a una importante alza de muertes bajo tratamiento de dosis alta de sildenafil y uso crónico, como también, por no ser eficaz en mejorar la capacidad de ejercicio. Sin embargo, posteriormente una revisión Cochrane realizada por Kelly y cols (2017) de la eficacia y seguridad del uso de sildenafil (administrado por cualquier ruta) para el tratamiento de hipertensión pulmonar neonatal, incluyó cinco estudios con 166 pacientes, y demostró una disminución significativa de la tasa de mortalidad en el grupo sildenafil comparada con placebo. A la vez, no se reportaron estudios en los cuales hubiese diferencias significativas entre grupo sildenafil versus grupo control activo (bajo tratamiento de otras drogas vasodilatadoras), ni tampoco se reportaron efectos adversos (Kelly y cols, 2017). Por todo lo anterior, los autores concluyeron que sildenafil tiene el potencial de disminuir la mortalidad de HAPN mejorando los índices de oxigenación (IO), especialmente en lugares donde el tratamiento de iNO no está disponible.

Clínicamente, los neonatos humanos con HAPN manifiestan taquipnea, cianosis, y aumento del índice de oxigenación. Es por esto que, para su diagnóstico y tratamiento definitivo es necesaria la realización de pruebas complementarias específicas como gases arteriales, ecocardiografía doppler, radiografías de tórax y electrocardiografía entre otros, las cuales podría no estar disponibles en algunos centros de salud. En el caso de este modelo animal, los neonatos de oveja presentaban principalmente taquipnea con confirmación del diagnóstico vía ecocardiográfica. El sildenafil aun se considera "*off label*", o uso fuera de indicación, a pesar de que existe evidencia de al menos 20 reportes clínicos, múltiples controles randomizados, estudios prospectivos y metaanálisis, los cuales reportan su eficacia al ser administrado por vía oral. La dosis

utilizada varía de 0.5-2 mg/kg cada 6 horas, con una titulación basada en la respuesta obtenida, no sobrepasando los 8 mg/kg día (Li y cols, 2021). También se reporta su uso de manera intravenosa como se ha realizado en esta tesis, intra-traqueal, enteral y en forma de nebulización tanto en modelos animales como en humanos (Engelbretch y cols, 2008; Evers y cols, 2020; Thompson y cols, 2019). Si bien la dosis utilizada en esta tesis fue menor en posología que lo indicado en otros estudios, se pudo evidenciar cambios significativos positivos para ciertas variables medidas y estudios *ex vivo*, lo que nos indica que es un fármaco potencialmente efectivo para la HAPN.

La importancia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas radica en que al menos un 30% de recién nacidos son resistentes a la terapia convencional de iNO para HAPN (Lakshminrusimha y Keszler, 2015; Martinho y cols, 2020). Además, se debe considerar que el costo de iNO es alto y requiere de equipamiento y entrenamiento especial, al igual que la ECMO. Al no existir este grado de especialización, tecnología e infraestructura disponibles, es imperativa la búsqueda de terapias como sildenafil que permita la estabilización y mejora de recién nacidos con esta patología (El-Ghandour y cols, 2020), sobre todo en poblaciones de tierras altas que se caracterizan por ser más empobrecidas (Herrera y cols, 2015).

En resumen, esta tesis demuestra que el uso de sildenafil como terapia vasodilatadora podría ser prometedora en neonatos de oveja gestados y nacidos en hipoxia crónica, principalmente por sus efectos agudos en la función vasodilatadora pulmonar pero más aún, por los cambios positivos observados en la función *ex vivo*, mejorando la disfunción endotelial 21 días después del cese del tratamiento, Si bien, al realizar la infusión cada 12 horas, no se observaron efectos en las variables cardiopulmonares a largo plazo, se estima necesario ahondar más al respecto como también por los efectos obtenidos en la estructura vascular. De igual forma es necesario destacar que a pesar de este pobre efecto cardiovascular *in vivo* a largo plazo, no se evidenció ningún efecto rebote, algo ya descrito en el tratamiento con iNO (Hussain y cols, 2017; Kelly y cols, 2017). Una posible causa de la falta de efecto clínico es el tiempo de tratamiento, la dosis administrada, o necesidad de complementar con oxigenoterapia.

Por lo tanto, creemos que futuras investigaciones debiesen centrarse en el efecto de la administración crónica de esta droga y/o su asociación con oxigenoterapia. Es importante destacar que a pesar de no evidenciar este efecto, sildenafil ha demostrado ser un fármaco útil en el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar del neonato, donde su administración de manera precoz en los neonatos de oveja no presentó ningún efecto adverso (Al Omar y cols, 2016; Gonzalez y cols, 2019; Feldman y cols, 2010). Esto amerita mayor investigación de los efectos de sildenafil en la función vascular pulmonar en neonatos de tierras altas.

Conclusión

Esta tesis demostró que sildenafil ejerce un efecto importante en la función vasodilatadora *ex vivo* y una recuperación de la función endotelial pulmonar en los neonatos de oveja gestados y nacidos en hipoxia hipobárica crónica, principalmente por los resultados miográficos en consecuencia con la expresión proteica de PDE-5. Estimamos que se justifica la realización de más estudios para determinar los mecanismos involucrados, considerando que su uso es mucho más accesible (costo y disponibilidad) para el tratamiento de la HAPN, sobretodo en zonas altiplánicas donde no se tiene acceso a las terapias tradicionales o consideradas “Gold estándar”.

REFERENCIAS

- Abman, S. H. (1999). Abnormal Vasoreactivity in the Pathophysiology of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Pediatrics in Review*, 20, e103–e109.
- Abman, S. H., Kinsella, J. P., Rosenzweig, E. B., Krishnan, U., Kulik, T., Mullen, M., ... & Humpl, T. (2013). Implications of the US Food and Drug Administration warning against the use of sildenafil for the treatment of pediatric pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(6), 572-575.
- Al Omar, S., Salama, H., Al Hail, M., Al Rifai, H., Bunahia, M., El kasem, W., Mansour, A. (2016). Effect of early adjunctive use of oral sildenafil and inhaled nitric oxide on the outcome of pulmonary hypertension in newborn infants. A feasibility study. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 9, 251–259.
- Alegría, RA. (2018). Caracterización cardiopulmonar de la transición feto-neonatal en ovejas (*Ovis aries*) de tierras bajas y del altiplano andino. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile.
- Argueta, E. E., & Paniagua, D. (2019). Thermodilution cardiac output: a concept over 250 years in the making. *Cardiology in review*, 27(3), 138-144.
- Balarini, C. M., Leal, M. A., Gomes, I. B. S., Pereira, T. M. C., Gava, A. L., Meyrelles, S. S., & Vasquez, E. C. (2013). Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *Journal of Translational Medicine*, 11, 1–8.
- Baquero, H., Soliz, A., Neira, F., Venegas, M. E., & Sola, A. (2006). Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: a pilot randomized blinded study. *Pediatrics*, 117(4), 1077-1083.
- Barreto, D. G., Fernández, R. G., Pérez-Velazco, J. G., Milián, A. C., & González, C. A. P. (2003). Diagnóstico preclínico de la aterosclerosis: Función endotelial. *Revista Cubana de Medicina*, 42, 58–63.
- Beñaldo F., F. A., Ferrada D, J. C., Castillo G., S., & Ebersperger D., G. (2017). Mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar neonatal. Una perspectiva molecular. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 33, 308–315.
- Bourjeily, Ghada; Rosene-Montella, K. (2009). Pulmonary Problems in Pregnancy. In *Clinical Pulmonary Medicine* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1097/00045413-199803000-00001>
- Buckley, M. S., Staib, R. L., Wicks, L. M., & Feldman, J. P. (2010). Phosphodiesterase-5 inhibitors in management of pulmonary hypertension: safety, tolerability, and efficacy. *Drug, healthcare and patient safety*, 2, 151.
- Burtscher, M. (2014). Effects of living at higher altitudes on mortality: a narrative review. *Aging and disease*, 5(4), 274.

- Cabral, J. E. B., & Belik, J. (2013). Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Recent advances in pathophysiology and treatment. *Jornal de Pediatria*, 89, 226–242.
- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(4), 303.
- Chester, A. H., & Yacoub, M. H. (2014). The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Global Cardiology Science and Practice*, 2014, 29.
- Corrado, C., & Fontana, S. (2020). Hypoxia and HIF signaling: One axis with divergent effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5611.
- Dakshinamurti, S. (2005). Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatric Pulmonology*, 39, 492–503.
- Dhariwal, A., & Bavdekar, S. (2015). Sildenafil in pediatric pulmonary arterial hypertension. *Journal of Postgraduate Medicine*, 61, 181.
- Dhillon, R. (2012). The management of neonatal pulmonary hypertension. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 97(3), F223-F228.
- Dones, M. C., & Dones, M. C. (2008). Papel de enfermería en el manejo del catéter de Swan-Ganz. *Enfermería intensiva*, 19(3), 141-149.
- Distefano, G., & Sciacca, P. (2015). Molecular physiopathogenetic mechanisms and development of new potential therapeutic strategies in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Italian journal of pediatrics*, 41(1), 1-11.
- Dupuis, J., & Hoeper, M. M. (2008). Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 31(2), 407-415.
- El-Ghandour, M., Hammad, B., Ghanem, M., & Antonios, M. A. M. (2020). Efficacy of Milrinone Plus Sildenafil in the Treatment of Neonates with Persistent Pulmonary Hypertension in Resource-Limited Settings: Results of a Randomized, Double-Blind Trial. *Pediatric Drugs*, 22, 685–693.
- Endo, A., Ayusawa, M., Minato, M., Takada, M., Takahashi, S., & Harada, K. (2000). Physiologic significance of nitric oxide and endothelin-1 in circulatory adaptation. *Pediatrics International*, 42(1), 26-30.
- Endo, A., Ayusawa, M., Minato, M., Takada, M., Takahashi, S., & Harada, K. (2001). Endogenous nitric oxide and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *European Journal of Pediatrics*, 160, 217–222.
- Engelbrecht, A. L., Chb, M. B., & Paed, M. (2008). Sildenafil in the management of neonates with PPHN: A rural regional hospital experience. *South African Journal of Child Health*, 2, 166–169.
- Evers, P. D., Critser, P. J., Cash, M., Magness, M., Hoelle, S., & Hirsch, R. (2020).

Cost-Utility of Sildenafil for Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *American journal of perinatology*.

- Feldman, J., Mitchell Buckley, Laura Wicks, Robin Staib, & Jeremy Feldman, J. (2010). Phosphodiesterase-5 inhibitors in management of pulmonary hypertension: Safety, tolerability, and efficacy. *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 2, 151.
- Galié, N., Manes, A., & Branzi, A. (2004). The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*, 61(2), 227-237.
- González-Candia, A., Candia, A. A., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Herrera, E. A. (2020). The newborn sheep translational model for pulmonary arterial hypertension of the neonate at high altitude. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 11, 452–463.
- Gonzalez, D., Laughon, M. M., Smith, P. B., Ge, S., Ambalavanan, N., Atz, A., ... Hornik, C. P. (2019). Population pharmacokinetics of sildenafil in extremely premature infants. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85, 2824–2837.
- Gordo-Vidal, F., Calvo-Herranz, E., Abella-Álvarez, A., & Salinas-Gabiña, I. (2010). Toxicidad pulmonar por hiperoxia. *Medicina intensiva*, 34(2), 134-138.
- Gupta, A., & Paria, A. (2019). Transition from fetus to neonate. *Surgery (United Kingdom)*, 37, 603–607.
- Hanson, K. A., Ziegler, J. W., Rybalkin, S. D., Miller, J. W., Abman, S. H., & Clarke, W. R. (1998). Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275, L931–L941.
- Herrera, E. A., Alegría, R., Farias, M., Díaz-López, F., Hernández, C., Uauy, R., Krause, B. J. (2016). Assessment of in vivo fetal growth and placental vascular function in a novel intrauterine growth restriction model of progressive uterine artery occlusion in guinea pigs. *The Journal of Physiology*, 594, 1553–1561.
- Herrera, E. A., Ebensperger, G., Krause, B. J., Riquelme, R. A., Reyes, R. V, Capetillo, M., ... Llanos, A. J. (2008). Sildenafil Reverses Hypoxic Pulmonary Hypertension in Highland and Lowland Newborn Sheep. *Pediatric Research*, 63, 169–175.
- Herrera, E. A., Farías, J. G., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Castillo, R. L. (2015). Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: a tale of two exposures. *Pharmacological research*, 101, 94-101.
- Herrera, E. A., Pulgar, V. M., Riquelme, R. A., Sanhueza, E. M., Reyes, R. V., Ebensperger, G., ... Llanos, A. J. (2007). High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, R2234–R2240.
- Herrera, E. A., Reyes, R. V., Giussani, D. A., Riquelme, R. A., Sanhueza, E. M.,

- Ebensperger, G., ... Llanos, A. J. (2007). Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovascular Research*, 77, 197–201.
- Heymann, M. A. (1999). Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 84, 127–132.
- Hill, C. M., Baya, A., Gavlak, J., Carroll, A., Heathcote, K., Dimitriou, D., ... Hogan, A. M. (2016). Adaptation to Life in the High Andes: Nocturnal Oxyhemoglobin Saturation in Early Development. *Sleep*, 39, 1001–1008.
- Hillman, N. H., Kallapur, S. G., & Jobe, A. H. (2012). Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clinics in perinatology*, 39(4), 769-783.
- Hussain, A. S., Ali, S. R., Ahmed, S., Farid, F. N., & Haroon, A. (2017). Oral sildenafil use in neonates with persistent pulmonary hypertension of newborn. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad: JAMC*, 29(4), 677.
- Hutter, D., Kingdom, J., & Jaeggi, E. (2010). Causes and Mechanisms of Intrauterine Hypoxia and Its Impact on the Fetal Cardiovascular System: A Review. *International Journal of Pediatrics*, 2010, 1–9.
- Jain, A., & McNamara, P. J. (2015). Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Advances in diagnosis and treatment. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 20, 262–271.
- Juliana, A. E., & Abbad, F. C. (2005). Severe persistent pulmonary hypertension of the newborn in a setting where limited resources exclude the use of inhaled nitric oxide: successful treatment with sildenafil. *European journal of pediatrics*, 164(10), 626-629.
- Kattan, J., González, A., Becker, P., Rodríguez, J. I., Estay, A., Faunes, M., ... & Canessa, R. (2005). Oxigenación con membrana extracorpórea en pacientes pediátricos: Comunicación de los 3 primeros casos tratados. *Revista médica de Chile*, 133(9), 1065-1070.
- Kelly, L. E., Ohlsson, A., & Shah, P. S. (2017). Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005494.pub4>
- Keyes, L. E., Armaza, F. J., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D. A., & Moore, L. G. (2003). Intrauterine Growth Restriction, Preeclampsia, and Intrauterine Mortality at High Altitude in Bolivia. *Pediatric Research*, 54, 20–25.
- Lakshminrusimha, S. (2021). Neonatal and Postneonatal Pulmonary Hypertension.
- Lakshminrusimha, S., & Keszler, M. (2015). Persistent Pulmonary Hypertension of the

Newborn. *NeoReviews*, 16, e680–e692.

- Lakshminrusimha, S., Konduri, G. G., & Steinhorn, R. H. (2016). Considerations in the management of hypoxemic respiratory failure and persistent pulmonary hypertension in term and late preterm neonates. *Journal of Perinatology*, 36, S12–S19.
- Lakshminrusimha, S., Mathew, B., & Leach, C. L. (2016). Pharmacologic strategies in neonatal pulmonary hypertension other than nitric oxide. *Seminars in Perinatology*, 40, 160–173.
- Lan, N., Massam, B., Kulkarni, S., & Lang, C. (2018). Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases*, 6, 38.
- Li, M., Sun, X., Li, Z., & Liu, Y. (2009). Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses serotonin signalling in pulmonary artery smooth muscles cells. *Pharmacological Research*, 59, 312–318.
- Li, Z., Lv, X., Liu, Q., Dang, D., & Wu, H. (2021). Update on the use of sildenafil in neonatal pulmonary hypertension: a narrative review of the history, current administration, and future directions. *Translational pediatrics*, 10(4), 998.
- Liu, X., Mei, M., Chen, X., Lu, Y., Dong, X., Hu, L. & Zhou, W. (2019). Identification of genetic factors underlying persistent pulmonary hypertension of newborns in a cohort of Chinese neonates. *Respiratory research*, 20(1), 1-10.
- Llanos, A. J., Ebersperger, G., Herrera, E. A., Reyes, R. V., Pulgar, V. M., Serón-Ferré, M., ... Riquelme, R. A. (2011). Fetal and postnatal pulmonary circulation in the Alto Andino. *Placenta*, 32, S100–S103.
- Luecke, C., & McPherson, C. (2017). Treatment of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Use of Pulmonary Vasodilators in Term Neonates. *Neonatal Network*, 36, 160–170.
- Márquez-González, H., Ibarra Ríos, D., Jean Tron, M. G., & Barajas-Nava, L. A. (2020). Uso de sildenafil para la hipertensión pulmonar en neonatos. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 77(4), 202-206.
- Martinho, S., Adão, R., Leite-Moreira, A. F., & Brás-Silva, C. (2020). Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Pathophysiological Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Frontiers in Pediatrics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00342>.
- Mikhail, G. W., Prasad, S. K., Li, W., Rogers, P., Chester, A. H., Bayne, S., ... & Gatzoulis, M. A. (2004). Clinical and haemodynamic effects of sildenafil in pulmonary hypertension: acute and mid-term effects. *European Heart Journal*, 25(5), 431-436.
- Milger, K., Felix, J. F., Voswinckel, R., Sommer, N., Franco, O. H., Grimminger, F., Gall, H. (2015). Sildenafil versus nitric oxide for acute vasodilator testing in pulmonary

arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, 5, 305–312.

Morton, S. U., & Brodsky, D. (2016). Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clinics in Perinatology*, 43, 395–407.

Mulvany, M.J. (2012). Small Artery Remodelling in Hypertension Basic Clin Pharmacol Toxicol. Jan;110(1):49-55.

Nair, J., & Lakshminrusimha, S. (2014). Update on PPHN: Mechanisms and treatment. *Seminars in Perinatology*, 38, 78–91.

Pak, O., Aldashev, A., Welsh, D., & Peacock, A. (2007). The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *European Respiratory Journal*, 30(2), 364-372.

Patel, H., Zaghoul, N., Lin, K. I., Liu, S. F., Miller, E. J., & Ahmed, M. (2017). Hypoxia-induced activation of specific members of the NF-κB family and its relevance to pulmonary vascular remodeling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 92, 141-147.

Poitras, E. L., Gust, S. L., Kerr, P. M., & Plane, F. (2020). Repurposing of the PDE5 inhibitor sildenafil for treatment of persistent pulmonary hypertension in neonates. *Current Medicinal Chemistry*, 27, 1–20.

Puthiyachirakkal, M., & Mhanna, M. J. (2013). Pathophysiology, Management, and Outcome of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: A Clinical Review. *Frontiers in Pediatrics*, 1, 1–6.

Ramani, G. V., & Park, M. H. (2010). Update on the clinical utility of sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug design, development and therapy*, 4, 61.

Rath C, Kluckow M. (2018). Pathophysiologically based management of persistent pulmonary hypertension of the newborn in Hemodynamics and cardiology: Neonatology questions and controversies..pp (155-174) Elsevier Health Sciences

Rivera Rosales, R. M. (2004). Histopatología y fisiopatogenia de la hipertensión pulmonar. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17.

Schwartz, B. G., Jackson, G., Stecher, V. J., Campoli-Richards, D. M., & Kloner, R. A. (2013). Phosphodiesterase type 5 inhibitors improve endothelial function and may benefit cardiovascular conditions. *American Journal of Medicine*, 126, 192–199.

Sharma, V., Berkelhamer, S., & Lakshminrusimha, S. (2015). Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology*, 1, 14.

Shekerdemian, L. S., Ravn, H. B., & Penny, D. J. (2002). Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(8),

1098-1102.

- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal*, *53*. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
- Steinhorn, R. H. (2010). Neonatal pulmonary hypertension. *Pediatric Critical Care Medicine*, *11*, S79–S84.
- Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: Cellular and molecular mechanisms. *Circulation Research*, *99*, 675–691.
- Storme, L., Aubry, E., Rakza, T., Houeijeh, A., Debarge, V., Tourneux, P., ... Pennaforte, T. (2013). Pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn: Impact of the perinatal environment. *Archives of Cardiovascular Diseases*, *106*, 169–177.
- Teixeira-Mendonça, C., & Henriques-Coelho, T. (2013). Pathophysiology of pulmonary hypertension in newborns: Therapeutic indications. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, *32*, 1005–1012.
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ (Online)*, *360*. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Thompson, E., Perez, K., Hornik, C., Smith, P., Clark, R., & Laughon, M. (2019). Sildenafil Exposure in the Neonatal Intensive Care Unit. *American Journal of Perinatology*, *36*, 262–267.
- Torres, F., González-Candia, A., Montt, C., Ebensperger, G., Chubretovic, M., Serón-Ferré, M., ... Herrera, E. A. (2015). Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Journal of Pineal Research*, *58*, 362–373.
- Walsh-Sukys, M. C., Tyson, J. E., Wright, L. L., Bauer, C. R., Korones, S. B., Stevenson, D. K., Fanaroff, A. A. (2000). Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn in the Era Before Nitric Oxide: Practice Variation and Outcomes. *Pediatrics*, *105*, 14–20.
- West, J. B. (2016). *Fisiologia Respiratoria. Fundamentos* (Lippincott Williams & Wilkins, Ed.).
- Wu, T. J., Teng, R. J., & Yau, K. I. T. (1995). Persistent pulmonary hypertension of the newborn treated with magnesium sulfate in premature neonates. *Pediatrics*, *96*, 472–474.
- Zhao, L., Mason, N. A., Morrell, N. W., Kojonazarov, B., Sadykov, A., Maripov, A., ... Wilkins, M. R. (2001). Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension.

Circulation, 104, 424–428.

ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado **“To be born high and flat (Andean Altiplano): healing vascular function and pulmonary”**, cuyo Investigador Responsable es el **Dr. Emilio Augusto Herrera Videla** del Programa Disciplinario de Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA 0761 FMUCH).

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

Se otorga la presente certificación por **48** meses, tiempo estimado de ejecución correspondiente al Proyecto FONDECYT REGULAR 1151119 (2015-2018).

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente(S)

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 25 de mayo de 2015.

