

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



**PAPEL DE RECEPTORES P2Y₂ Y/O P2Y₄ EN VENAS
INTRAPULMONARES PEQUEÑAS EN UN MODELO DE
HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR**

ÓSCAR LEONARDO ARELLANO PÉREZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGÍA

**Directores de Tesis: Dr. Mauricio Henríquez L.
Dra. Emilia Sanhueza R.**

2016

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



**PAPEL DE RECEPTORES P2Y₂ Y/O P2Y₄ EN VENAS
INTRAPULMONARES PEQUEÑAS EN UN MODELO DE
HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR**

ÓSCAR LEONARDO ARELLANO PÉREZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLOGÍA

**Directores de Tesis: Dr. Mauricio Henríquez L.
Dra. Emilia Sanhueza R.**

2016

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

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

ÓSCAR LEONARDO ARELLANO PÉREZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magíster en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Septiembre de 2016.

Prof. Dr. Mauricio Henríquez L.
Director de Tesis
Programa de Fisiología, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Prof. Dra. Emilia Sanhueza R.
Co-Directora de Tesis
Programa de Fisiopatología, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DRA. LAURA MENDOZA I.

PROF. DR. GERMÁN EBENSBERGER D.

PROF. DR. LUIS FERNANDO MICHEA A.

PROF. DRA. JULIA GUERRERO P.
Presidente Comisión de Examen

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín Trifosfato
ARE	Antagonista del Receptor de Endotelina
CaM	Calmodulina
DAG	Diacilglicerol
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
ET-1	Endotelina 1
ET-A	Receptor A de Endotelina-1
ET-B	Receptor B de Endotelina-1
GMPC	Guanosín Monofosfato Cíclico
HP	Hipertensión Pulmonar
HAP	Hipertensión Arterial Pulmonar
HAP-MCT	Hipertensión Arterial Pulmonar inducida por Monocrotalina
HVP	Hipertensión Venosa Pulmonar
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trifosfato
IP ₃ R	Receptor de Inositol 1,4,5-Trifosfato
MCT	Monocrotalina
MLC	Cadena Liviana de la Miosina
MLCK	Kinasa de la Cadena Liviana de la Miosina
MLCP	Fosfatasa de la Cadena Liviana de la Miosina
NCX	Intercambiador Sodio/Calcio
NO	Óxido Nítrico
PAAT	Tiempo de Aceleración Pulmonar
PAP	Presión de Arteria Pulmonar
PAPm	Presión de Arteria Pulmonar Media
PDE-5	Fosfosdiesterasa-5

PG ₁₂	Prostaglandina I ₂
PKA	Proteína Kinasa A
PKG	Proteína Kinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Bomba de Calcio de la Membrana Plasmática
PTDVI	Presión Telediastólica del Ventrículo Izquierdo
RVP	Resistencia Vascular Pulmonar
sGC	Guanilato Ciclasa Soluble
U.W.	Unidades Wood
UTP	Uridín Trifosfato
VIP	Vena Intrapulmonar Pequeña

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. FUNDAMENTO	16
1.1. Hipertensión Pulmonar (HP)	16
1.1.1. Generalidades de la HP	16
1.1.2. Clasificación de la HP	17
1.1.3. Modelo Experimental de Hipertensión Arterial Pulmonar inducida por Monocrotalina	20
1.1.4. Tratamiento de la HAP	22
1.2. Contribución del Sistema Venoso a la RVP	24
1.2.1. HAP causada por Hipertensión Venosa Pulmonar (HVP)	24
1.2.2. Respuesta Contráctil de Venas Intrapulmonares	25
1.2.3. Organización estructural de venas intrapulmonares	26
1.3. Regulación del Tono Vascular Pulmonar	28
1.3.1. Tono Vascular	28
1.3.2. Proceso Contráctil del Músculo Liso	28
1.3.3. Tono vascular pulmonar	30
1.4. Señalización Purinérgica	32
1.4.1. Generalidades de la Señalización Purinérgica	32
1.4.2. Señalización Purinérgica en Vasos Sanguíneos	33
1.4.3. Señalización Purinérgica en la Regulación del Tono Vascular Pulmonar	35
1.4.4. Señalización Purinérgica en Hipertensión Pulmonar	36
2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVO GENERAL	39
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.1. Objetivo Específico 1:	40
4.2. Objetivo Específico 2:	40
4.3. Objetivo Específico 3:	40
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
5.1. Objetivo Específico 1:	41
5.2. Objetivo Específico 2:	42
5.3. Objetivo Específico 3:	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1. Modelo de HAP inducido por MCT	44
6.2. Preparación de rebanadas de pulmón de rata	44
6.3. Venas Intrapulmonares en rebanadas de pulmón de rata	47
6.4. Medición de contracción de venas intrapulmonares pequeñas	49
6.5. Inmunofluorescencia indirecta	50

6.6.	Análisis Estadístico.....	51
7.	RESULTADOS.....	52
7.1.	Control de Modelo de HAP-MCT	52
7.2.	Respuesta contráctil de VIP en respuesta a UTP	55
7.3.	Contribución de los receptores P2Y ₂ y P2Y ₄ en la contracción inducida por UTP	67
7.4.	Expresión de receptores P2Y ₂ y/o P2Y ₄ en células musculares lisas y células endoteliales de VIP.....	83
8.	DISCUSIÓN.....	117
9.	CONCLUSIÓN	123

RESUMEN

La Hipertensión Pulmonar (HP) es una patología vascular compleja que conduce a falla cardíaca, menor expectativa de vida y tiene un impacto significativo en la sociedad, ya que produce la muerte de pacientes en edad productiva e implica altos costos de financiamiento en su tratamiento.

Existe evidencia sobre la contribución de venas intrapulmonares a la Resistencia Vascular Pulmonar (RVP). La Hipertensión Venosa Pulmonar (HVP) puede producir un incremento en la RVP y aumentar la Presión Arterial Pulmonar (PAP), debido a transmisión pasiva de la presión venosa al territorio arterial.

La familia de receptores purinérgicos se encuentra ampliamente expresada en diversos vasos sanguíneos y se ha descrito respuesta contráctil de arterias intrapulmonares a nucleótidos, en particular a Uridín Trifosfato (UTP). La investigación del rol de la señalización purinérgica en la circulación pulmonar venosa podría aportar información relevante para abordar otra vía involucrada en la fisiopatología de la HAP.

Se realizaron rebanadas de pulmón de ratas Sprague Dawley controles y con HAP inducida por Monocrotalina (HAP-MCT), en un vibrátomo a 150 μm de espesor. La respuesta contráctil de Venas Intrapulmonares Pequeñas (VIP) inducida por UTP se registró mediante videomicroscopía de contraste de fases (VMCF), demostrando actividad del nucleótido como agente vasoconstrictor en VIP, con mayor respuesta en la VIP provenientes de ratas con HAP-MCT ($EC_{50} = 8,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$) que en las control ($EC_{50} = 16 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$). Las imágenes de inmunofluorescencia muestran expresión de los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ en la capa media de VIP de ratas control y con HAP-

MCT. Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo involucrado en la HAP, orientando el estudio de nuevas terapias para combatir el curso de la enfermedad, mejorar la sobrevivencia y la calidad de vida de pacientes que padecen HAP.

ABSTRACT

Pulmonary Hypertension (HP) is a complex vascular condition that leads to heart failure, lower life expectancy and has a significant impact on society, because it involves the death of patients of working age and involves high costs of financing treatment. Pulmonary Venous Hypertension (HVP) may cause an increase in Pulmonary Vascular Resistance (RVP), Pulmonary Artery Pressure (PAP) is increased by the HVP, due to passive transmission of venous pressure to arterial territory. There is also evidence on the contribution of intrapulmonary veins to the RVP. Purinergic receptor family is widely expressed in various blood vessels and described intrapulmonary artery contractile responses to nucleotides, especially Uridine Triphosphate (UTP). The investigation of the role of purinergic signaling in the pulmonary venous circulation could provide relevant information to address another pathway involved in the pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension (HAP).

Lung slices from Sprague Dawley rats controls and rats with Pulmonary Hypertension monocrotaline induced (HAP-MCT), were made from vibratome to 150 μm thick . The contractile response of small intrapulmonary veins (VIP) was recorded by videomicroscopy phase contrast (VMCF), showing nucleotide activity as a vasoconstrictor agent in VIP, with greater response in the VIP from rats HAP-MCT ($\text{EC}_{50} = 8.8 \pm 1,4 \mu\text{M}$) than in control ($\text{EC}_{50} = 16 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$)). Immunofluorescence images show expression of P2Y2 and P2Y4 receptors in the middle layer of VIP of control and HAP-MCT rats. These findings suggest a new mechanism involved in PAH, directing the study of new therapies to combat disease course, improve survival and life quality of these patients.

1. FUNDAMENTO

1.1. Hipertensión Pulmonar (HP)

1.1.1. Generalidades de la HP

La HP se define hemodinámicamente como un valor de Presión Arterial Pulmonar media (PAPm) mayor a 25mmHg en reposo (Hoeper et al., 2013). La HP compromete tanto al sistema respiratorio como al cardíaco, y afecta a cien millones de personas en el mundo (Simonneau et al., 2013). El desarrollo de la enfermedad conduce a remodelamiento vascular, aumento de la presión arterial pulmonar (PAP), aumento de la postcarga ventricular derecha, produciendo hipertrofia miocárdica. La HP es una patología vascular compleja que conduce a falla cardíaca, menor expectativa de vida, teniendo un impacto significativo en la sociedad dado que involucra la muerte de pacientes en edad productiva (Michelakis et al., 2013). La calidad de vida de los pacientes con HAP ha mejorado en los últimos años gracias a las terapias actuales, sin embargo ninguna puede revertir o curar la enfermedad (McLaughlin et al., 2009). La esperanza está en el avance de los estudios en ciencias básicas y preclínicos sobre HAP, pero su aplicación en humanos aun no ha sido totalmente desarrollada (Sutendra et al., 2013).

1.1.2. Clasificación de la HP

Inicialmente la HP fue clasificada en dos categorías: 1) HP Primaria o 2) HP Secundaria, de acuerdo a la presencia de factores de riesgos o si existía alguna causa identificada. Desde el segundo Simposio Internacional sobre HP realizado en 1998 en Evian, se instauró una nueva clasificación clínica con el objetivo de individualizar a cada grupo de acuerdo a sus características patológicas, hemodinámicas y manejo terapéutico. Se identificaron 5 grupos de trastornos que producen la enfermedad (Simonneau et al., 2013):

- Grupo 1: Hipertensión Arterial Pulmonar
- Grupo 2: Hipertensión Pulmonar debido a falla cardíaca izquierda
- Grupo 3: Hipertensión Pulmonar debido a enfermedad pulmonar crónica y/o hipoxia
- Grupo 4: Hipertensión Pulmonar Tromboembólica Crónica
- Grupo 5: Hipertensión Pulmonar debido a mecanismos multifactoriales no claros

En los encuentros mundiales posteriores sobre HP, se realizó una serie de cambios que reflejan el progreso en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. El año 2013 se realizó en Niza, Francia, el 5° Simposio mundial sobre HP, donde se actualizó esta clasificación con énfasis en el Grupo 1 de la HP (Tabla 1) (Simonneau et al., 2013).

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión Pulmonar

Grupo 1 HAP	Grupo 2 Asociado a enfermedad cardíaca izquierda	Grupo 3 Asociado a enfermedad pulmonar / Hipoxia	Grupo 4 HPTEC	Grupo 5 Hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales no claros
1.1 Idiopática (HAPI) 1.2 Hereditaria 1.3 Inducida por fármacos y toxinas 1.4 Asociada con: 1.4.1 Enfermedad del tejido conectivo 1.4.2 VIH 1.4.3 Hipertensión Portal 1.4.4 Enfermedad cardíaca congénita 1.4.5 Esquistosomiasis 1' Enfermedad pulmonar venosa oclusiva y/o hemangiomatosis capilar pulmonar 1'' Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido	2.1 Disfunción sistólica ventricular izquierda 2.2 Disfunción diastólica ventricular izquierda 2.3 Enfermedad valvular 2.4 Obstrucción congénita / adquirida del tracto de entrada / salida del ventrículo izquierdo y miocardiopatías congénitas	3.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) 3.2 Enfermedad pulmonar intersticial 3.3 Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto, obstructivo y restrictivo. 3.4 Trastornos respiratorios del sueño 3.5 Trastorno de hipoventilación alveolar 3.6 Exposición crónica a altas alturas 3.7 Enfermedades pulmonares del desarrollo	Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica	5.1 Trastornos hematológicos: anemia hemolítica crónica, desordenes mieloproliferativos, esplenectomía. 5.2 Trastornos sistémicos: sarcoidosis, histiocitosis pulmonar, linfangioleiomiomatosis 5.3 Trastornos metabólicos: enfermedad de almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos tiroideos. 5.4 Otros: Obstrucción tumoral, Mediastinitis fibrosante, Falla renal aguda, Hipertensión pulmonar segmentaria.

Modificado de Simonneau et al. 2013.

1.1.2.1. Grupo 1: Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)

El grupo 1 es un conjunto de síndromes en los que la HP refleja patología arterial pulmonar. La definición hemodinámica de este grupo junto a los valores de PAPm sobre 25mmHg en reposo, considera además una presión telediastólica ventricular izquierda (PTDVI) menor a 15mmHg y una resistencia vascular pulmonar (RVP) sobre 3 Unidades Wood (U.W) (Simonneau et al., 2013, Hoeper et al., 2013). Si bien este grupo comparte características histológicas, resulta ser bastante heterogéneo ya que incluye síndromes tan distintos como la idiopática y la asociada a esquistosomiasis. Este grupo también incluye aquellos pacientes con enfermedad pulmonar veno-oclusiva y/o Hemangiomatosis Capilar Pulmonar, y con Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (Ryan et al., 2011, Simonneau et al., 2013).

1.1.3. Modelo Experimental de Hipertensión Arterial Pulmonar inducida por Monocrotalina

La Monocrotalina (MCT) es un derivado de la semilla de la planta *Crotalaria Spectabilis*, e induce injuria vascular pulmonar por la generación de metabolitos pirrol (Ryan et al., 2011). Ya en el año 1967 se demostró que ratas alimentadas con MCT desarrollaban hipertensión pulmonar (Kay et al., 1967). La administración subcutánea de una dosis de 100mg/kg de MCT en ratas resultaba en hipertensión pulmonar en alrededor de tres semanas, llevando a la muerte a la mayoría de éstas dentro de seis a ocho semanas (Urboniene et al., 2010). El modelo murino de Hipertensión Arterial inducida por Monocrotalina (HAP-MCT) recapitula muchas características de la HAP humana, ya que produce tumefacción mitocondrial y apoptosis de la células endotelial (Rosenberg et al., 1988), con generación de especies reactivas de oxígeno que pueden ser tóxicas para las células endoteliales (Ryan et al., 2011). La PAPm aumenta en ratas sometidas a inyección de MCT hasta valores sobre los 35mmHg (Okada et al., 1997).

El modelo de HAP-MCT con una administración de 60 mg/kg, produce alteraciones histológicas como hipertrofia de la capa media e hiperplasia de la íntima sin generar trombosis *in situ* (Ryan et al., 2011). En relación a las variables hemodinámicas, produce un aumento en la RVP mayor a 3 U.W., disminución del gasto cardíaco, sin generar alteraciones en la PTDVI y ni en el ventrículo izquierdo propiamente tal (Ryan et al., 2011). El análisis eco-cardiográfico arroja valores del Tiempo de aceleración pulmonar (PAAT) que indican aumento de la PAP (Urboniene et al. 2010). Además permite visualizar un aumento en el espesor de la pared del

ventrículo derecho, debido a hipertrofia ventricular como consecuencia de la administración de MCT (Jones et al., 2002). Esta condición ha sido confirmada en estudios *post mortem* por medio del índice de Fulton, que cuantifica la hipertrofia ventricular derecha (Mam et al., 2010). La dosis de MCT de 60 mg/kg presenta selectividad por el territorio vascular pulmonar, ya que no produce alteración de los vasos sistémicos, de las vías aéreas, a diferencia de otros modelos. En términos moleculares, no altera la vía de señalización de la Serotonina, no aumenta la expresión de Endotelina-1 (ET1) ni de canales de Potasio (Kv 1.5). Esta dosis produce muerte aproximadamente a los dos meses posteriores a la administración (Ryan et al. 2011).

El modelo de HAP-MCT se ha usado ampliamente para el estudio de esta enfermedad. Por ejemplo, en 1985, se realizó un estudio para determinar si en la HP, el músculo liso vascular pulmonar tiene alterada su capacidad de responder a estímulos vasodilatadores por medio de este modelo (Altiere et al., 1985). También se ha estudiado los mecanismos involucrados en el efecto vasodilatador de Modafinilo en la HAP en ratas tratadas con MCT (Lee et al., 2015). Un trabajo reciente demostró que Sildenafil mejora las variables hemodinámicas medidas por medio de cateterización cardíaca y ecocardiografía en ratas con HAP-MCT (Yoshiyuki et al., 2016). Estos antecedentes demuestran que el modelo de rata tratada con MCT es aceptado para el estudio del grupo 1 de la HP humana.

1.1.4. Tratamiento de la HAP

En la fisiopatología de la HAP, las vías involucradas más conocidas son las de ET-1, de Óxido Nítrico (NO) y de Prostaciclina. En la práctica clínica se utilizan tratamientos relacionados con estas tres vías, entre ellos antagonistas para el receptor de ET-1, inhibidores de la Fosfodiesterasa-5 y agonistas de Prostaciclina (Galié et al., 2013). Recientemente se sumaron los fármacos estimuladores de la Guanilato ciclasa soluble (sGC), que actúan independientemente de la presencia de NO (Figura 1) (Montani et al., 2014). La implementación de estos fármacos ha permitido alcanzar mejorías clínicas, funcionales y hemodinámicas, pero por tratarse de una patología hasta ahora incurable, los pacientes continúan con un mal pronóstico (Montani et al., 2014).

Además de mejorar la eficacia y facilitar la administración de terapias ya instauradas, se han desarrollado nuevos tratamientos que han alcanzado incluso la tercera fase de la investigación clínica. Estudios pre-clínicos han descubierto mecanismos que podrían jugar un rol importante en la compleja fisiopatología de la HAP, incluyendo estudios genéticos, sobre factores de transcripción y otras vías de señalización. El descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos podría cambiar la visión a futuro de la terapia para la HAP (Galié et al., 2013).

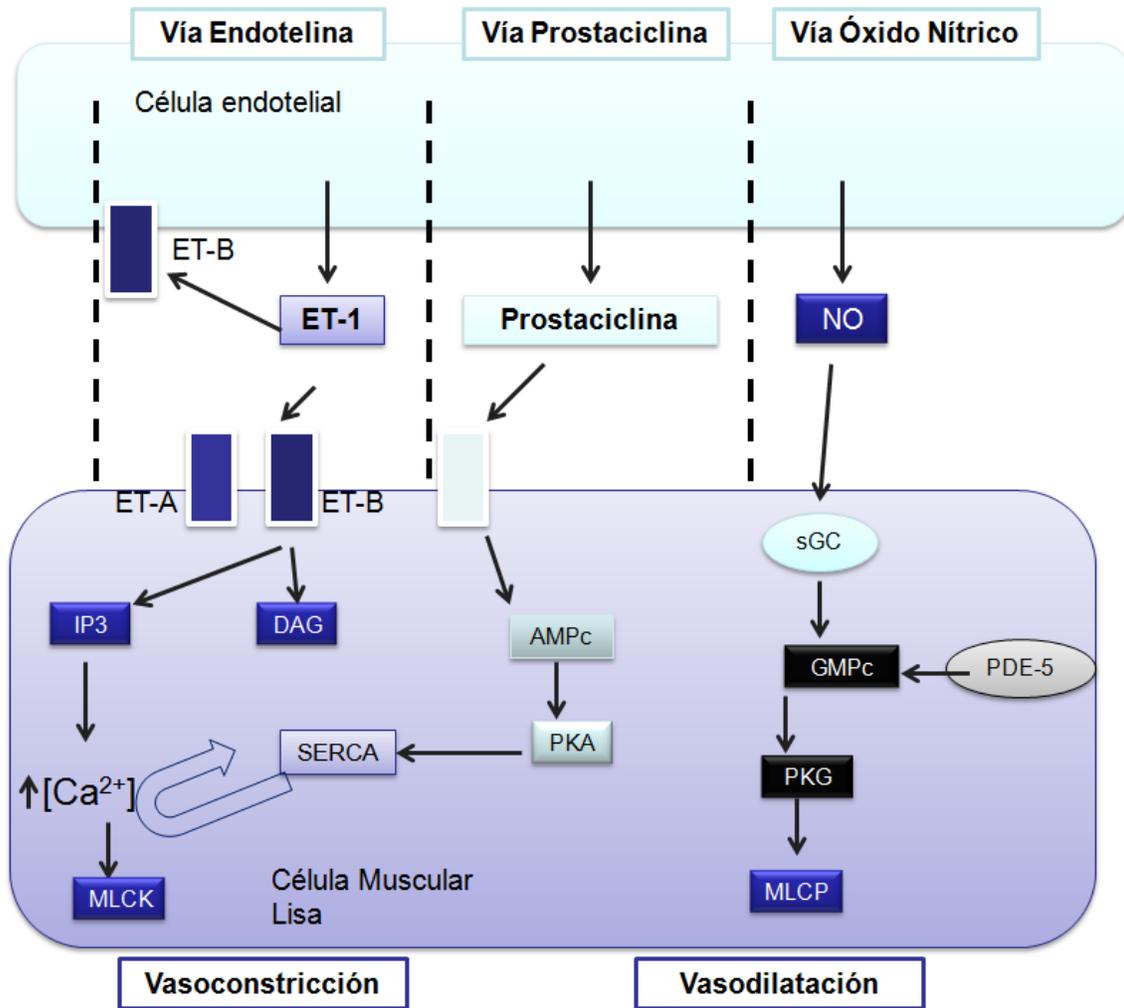


Figura 1. Vías fisiopatológicas que orientan los objetivos terapéuticos en la HAP.
 (Modificado de Bevacqua et al. 2013).

1.2. Contribución del Sistema Venoso a la RVP

1.2.1. HAP causada por Hipertensión Venosa Pulmonar (HVP)

La HVP puede producir un incremento en la RVP. La PAP aumenta por HVP, debido a transmisión pasiva de la presión venosa hacia el territorio arterial. El incremento en la presión intravascular produce aumento del estrés de la pared en las arterias de resistencia, generando estiramiento y aumento de tensión en las células musculares lisas, activando sus mecanorreceptores gatillando vasoconstricción, que lleva a un aumento en la RVP y cambios estructurales posteriores, es decir, hipertrofia de la capa media e hiperplasia de la íntima. Estos mecanismos explicarían el impacto de la HVP en la RVP (Kulik 2014).

Estos antecedentes muestran la necesidad de estudiar el sistema venoso y su contribución en la RVP, en particular en cuadros tan complejos como la HAP.

1.2.2. Respuesta Contráctil de Venas Intrapulmonares

La Circulación Pulmonar consiste en tres territorios vasculares dispuestos en serie: arterias, capilares y venas. Si bien en la circulación sistémica es claro que las arteriolas son las mayores determinantes de la resistencia vascular, ha existido confusión sobre la contribución de arterias, capilares y venas a la resistencia al flujo sanguíneo en el pulmón(Gao et al., 2005). Esto se debe a que los datos expuestos en la literatura sobre la circulación pulmonar son metodológicamente heterogéneos, tanto por la forma de determinar la resistencia vascular, como por las condiciones experimentales y las especies en que se han medido (Gao et al., 2005).

La RVP puede ser medida usando métodos directos e indirectos, además de las mediciones de presión de la arteria pulmonar y atrio izquierdo, en otros sitios de la circulación pulmonar. Esto ha permitido aproximar la contribución de cada territorio vascular y el comportamiento de cada uno por separado (Gao et al., 2005). Por ejemplo, se ha realizado la medición directa de la presión de capilares pulmonares pequeños, arteriolas y vénulas por medio del uso de micro-catéteres que son introducidos en pequeñas arterias del pulmón. Por métodos indirectos como la técnica de la oclusión de la arteria pulmonar, la circulación pulmonar también ha sido dividida en 3 segmentos vasculares(Gao et al., 2005). El uso de esta técnica en pulmones adultos, indica que las venas parecen contribuir en la resistencia vascular pulmonar total al flujo al menos en 7% en conejos y en un 40% en gatos(Gao et al., 2005). La medición de presión en vénulas utilizando micro-catéteres, también sugiere gran contribución del sistema venoso a la RVP (Gao et al., 2005). Visto

desde esta perspectiva las venas no sólo sirven como conductos por los cuales circula sangre oxigenada hacia la circulación sistémica, sino que también contribuyen a la RVP. Los cambios en el tono venoso permiten regular tanto la distensión, como el reclutamiento de capilares alveolares (Gao et al., 2005). Sin duda el sistema venoso pulmonar es un componente importante de la RVP, por lo que podría estar involucrado en el desarrollo de diferentes condiciones fisiopatológicas como la HAP.

1.2.3. Organización estructural de venas intrapulmonares

Las venas intrapulmonares tienen características estructurales únicas, como la presencia de músculo cardíaco en venas de mayor calibre y músculo liso dispuesto como esfínter en venas más delgadas (Hosoyamada et al., 2010). La presencia de músculo cardíaco en venas pulmonares se ha descrito desde el siglo XIX, y ha sido reportado en varias especies animales (Endo et al., 1997), mientras que la disposición del músculo liso como esfínter ha sido descrita desde 1975 (Paes de Almeida et al., 1975). Posterior a estos trabajos, la distribución y disposición del músculo cardíaco y liso en el árbol venoso pulmonar, fue confirmado por Hosoyamada en el 2010 (Hosoyamada et al., 2010). En ratas se ha descrito la distribución de estos tipos de células musculares, lo que permite distinguir el perfil venoso del arterial, por la presencia de células musculares lisas en el lado luminal de la lámina elástica (excepto para las extremadamente delgadas), mientras que la lámina elástica arterial es separada desde el lumen sólo por una delgada capa endotelial. La capa de músculo liso es delgada en los segmentos venosos con

músculo cardíaco y aumenta su espesor en los segmentos venosos sin músculo cardíaco. Las células musculares lisas en los segmentos sin músculo cardíaco, se presentan como una capa continua de células musculares lisas circulares, en las venas con un diámetro vascular mayor a 180 μm , en cambio, las de venas más pequeñas, entre 50 y 180 μm de diámetro vascular, presentan una distribución como capa discontinua de células musculares lisas. A medida que los vasos venosos con presencia parcial de músculo liso llegan a ser más pequeños en diámetro, la densidad de células musculares lisas disminuye gradualmente hasta llegar a ser capilares sin células musculares lisas en segmentos con diámetro vascular menor a 50 μm (Hosoyamada et al., 2010).

Existe evidencia suficiente que respalda la contribución de las venas intrapulmonares a la RVP, sin embargo, se hace necesario ahondar en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los cambios del tono venoso pulmonar.

1.3. Regulación del Tono Vascular Pulmonar

1.3.1. Tono Vascular

Tono Vascular se define como un estado de contracción mantenida del músculo liso de la pared vascular y es el proceso por el cual el vaso sanguíneo lleva a cabo sus funciones fisiológicas, sus respuestas farmacológicas y sus cambios patológicos (Webb et al., 1981). El tono vascular basal es un requisito previo para las influencias vasodilatadoras. Se establece que una vasoconstricción de los vasos permite una "reserva de flujo sanguíneo regional" sobre el cual otros mecanismos de control producen vasodilatación o vasoconstricción (Davis et al. 1999).

1.3.2. Proceso Contráctil del Músculo Liso

Existen dos tipos de músculos: el músculo estriado, que incluye el músculo esquelético y el cardíaco; y el músculo no estriado, que corresponde al músculo liso, presente en los sistemas vascular, respiratorio, uterino y gastrointestinal. En todos los tipos de músculos el aparato contráctil contiene proteínas como: actina y miosina, y la contracción se gatilla por aumento del calcio citosólico. El calcio extracelular tiene una concentración de aproximadamente de 2-4mM y el citosólico, en reposo, es aproximadamente de 100nM. Las células musculares lisas también contienen canales de calcio dependientes de voltaje y su despolarización causa la apertura de los canales de calcio tipo L, permitiendo el ingreso del catión a favor de su gradiente

de concentración. Otro mecanismo que controla la contracción en estas células es el receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R). Algunos mediadores pueden actuar a través de receptores acoplados a proteína G para generar el segundo mensajero Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), por medio de la activación de la Fosfolipasa C (PLC), para que IP_3 se una a su receptor IP_3R en el retículo endoplasmático produciendo la liberación de calcio que va a desencadenar la contracción. Una vez que el calcio intracelular aumenta se une a Calmodulina (CaM) que interactúa con la Kinasa de la Cadena Liviana de la Miosina (MLCK), produciendo la fosforilación de la Cadena Liviana de la Miosina (MLC). Estando fosforilada la cadena liviana de la miosina forma puentes cruzados con actina que lleva a la contracción. Finalmente el calcio y el complejo Calcio-CaM también se unen a otras proteínas en las células musculares lisas, incluyendo la Fosfatasa Calcineurina y Proteínas Kinasas como CamKIV, que modulan otras funciones celulares, como factores de transcripción que controlan la expresión génica de programas que tienen efectos a largo plazo en la fisiología de la célula muscular lisa. Los diferentes mecanismos de liberación de calcio también estimulan la bomba de calcio de retículo sarcoplásmico (SERCA), la Bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA), el intercambiador Sodio/Calcio (NCX) que remueven el calcio del citosol. Cuando disminuye la concentración citosólica de calcio este se disocia de CaM y termina el proceso de contracción. Las principales vías que promueven la relajación del músculo liso incluyen los segundos mensajeros Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc) y el Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc). El AMPc es generado por la Adenilato Ciclasa, posterior a la estimulación de un Receptor acoplado a Proteína Gs. El GMPc puede ser activado por NO o por Péptidos Natriuréticos. En los vasos sanguíneos, el NO es producido por la Óxido

Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), y éste difunde a través de la membrana plasmática de la célula muscular para activar la sGC que aumenta los niveles de GMPc. El AMPc y el GMPc por medio de la activación de la Proteína Kinasa A (PKA) y la Proteína Kinasa G (PKG) producen la fosforilación de Bombas de Calcio aumentando su actividad, la activación de la Fosfatasa de la Cadena Liviana de la Miosina (MLCP) por PKG, antagonizando la actividad de la MLCK, produciendo en consecuencia la relajación muscular. Al mismo tiempo PKA y PKG causan reducción en la sensibilidad de la maquinaria contráctil por la inhibición de la GTPasa Rho-A (esto aumenta la actividad de la MLCP y causa desfosforilación de la MLC) (Kuo et al., 2015).

1.3.3. Tono vascular pulmonar

La circulación pulmonar se encuentra bajo el control de factores activos y pasivos. Dentro del primer grupo, encontramos mecanismos neurales, humorales y reguladores gaseosos que afectan el tono de la musculatura lisa vascular. Los factores pasivos incluyen cambios en el gasto cardíaco, presión del atrio izquierdo, presión de la vía aérea, la fuerza gravitacional, la obstrucción y el reclutamiento vascular. Si bien los factores pasivos pueden ser importantes en algunas circunstancias, la circulación pulmonar es regulada principalmente por el control activo, el que hace referencia a los mediadores neuro-humorales involucrados con el control del tono vascular pulmonar (Liu et al., 1994).

1.4. Señalización Purinérgica

1.4.1. Generalidades

El Adenosín Trifosfato (ATP), además de sus funciones intracelulares, actúa como una molécula de señalización extracelular a través de una amplia gama de receptores (Burnstock 2007).

Los receptores P1 son selectivos para la adenosina, un producto de degradación de ATP, liberado por la acción de ectonucleotidasas. Se han identificado, cuatro subtipos de receptores P1: A1, A2A, A2B y A3 (Burnstock et al., 2007).

Los receptores P2 son activados por purinas y algunos subtipos también por pirimidinas. Los receptores P2X son conocidos como una amplia familia de receptores ionotrópicos estimulados por ATP. La otra subclase de esta familia, los receptores P2Y, comprenden un conjunto de receptores acoplados a proteína G (North et al. 1997).

1.4.2. En Vasos Sanguíneos

La señalización purinérgica controla el tono vascular además de participar en el fenómeno de remodelamiento vascular, existiendo diferencias en los mecanismos de regulación purinérgica en diferentes vasos sanguíneos y entre especies, en relación con la función fisiológica del vaso en particular (Burnstock et al., 2014).

Una característica común para los vasos sanguíneos es el control dual en el tono vascular por ATP, liberado como co-neurotransmisor junto a Noradrenalina produce vasoconstricción por medio de receptores P2X, mientras que el liberado en respuesta a la hipoxia y al *shear stress*, produce vasodilatación por medio de la activación de receptores P2Y presentes en células endoteliales (Burnstock et al., 2007).

La liberación de nucleótidos desde células endoteliales ocurre por medio de un mecanismo de transporte vesicular (Bodin et al., 2001) y hemicanales de conexinas (Faigle et al., 2008). En un endotelio intacto, estos nucleótidos pueden producir vasodilatación, pero cuando existe daño endotelial estos pueden actuar como mediadores vasoconstrictores vía receptores P2 en células musculares lisas (Burnstock et al., 2014).

Las ectonucleotidasas son ectoenzimas asociadas a la membrana celular y participan en la regulación de las concentraciones extracelulares de los nucleótidos y nucleósidos (Yegutkin et al., 2008, Zimmermann et al., 2012). Estas incluyen

Ectonucleotidasa 5'-Trifosfato di-fosfohidrolasa (E-NTPDasas), incluyendo E-NTPDasa1/ecto-ATPasa/CD39, que hidroliza nucleótidos tri y difosfato, encontradas en la superficie de células endoteliales y musculares lisas, y E-NTPDasa2 (CD39L1) presente en la capa adventicia de vasos sanguíneos hidrolizando nucleótidos Trifosfato. La Ecto-5'-nucleotidasas (CD73) y las fosfatasas alcalinas catalizan la formación extracelular de adenosina desde AMP. La acción de los nucleótidos extracelulares en los receptores purinérgicos a nivel de la superficie celular, responden al balance entre su liberación desde la célula, por mecanismos mencionados antes, y la hidrólisis por ectonucleotidasas (Burnstock et al., 2014).

Si bien no existe una amplia gama de ligandos selectivos para los diferentes subtipos de receptores P2, el uso de múltiples enfoques experimentales y la disponibilidad comercial de ligandos sintéticos ha permitido generar una buena predicción del subtipo de receptores P2 presentes en los vasos sanguíneos. El principal objetivo de caracterizar estas entidades es el desarrollo de ligandos selectivos para discriminar entre diferentes receptores P2X y P2Y. Los agonistas disponibles actualmente no discriminan con certeza entre receptores P2Y₂ y P2Y₄, y lo descrito al respecto, es que uno o ambos son expresados en tejidos donde la respuesta a Uridín Trifosfato (UTP) ha sido demostrada (Burnstock et al., 2014)

1.4.3. En la Regulación del Tono Vascular Pulmonar

Se ha descrito actividad contráctil de células musculares lisas de arterias intrapulmonares de rata en respuesta a nucleótidos (Inoue et al., 1988). En arterias intrapulmonares de ratas desprovistas de endotelio, se ha observado respuesta contráctil, presumiblemente por medio de los receptores P2Y₂ y aquellos sensibles a Uridín Difosfato (UDP) (Hartley et al., 1998). Un estudio en pulmones perfundidos de rata, demostró similar respuesta vasoconstrictora inducida por ATP, UDP y Uridín Trifosfato (UTP) en arterias intrapulmonares y Suramina, un antagonista inespecífico de receptores purinérgicos, sólo inhibió la respuesta inducida por ATP (Rubino et al., 1996). Posteriormente, ATP mostró ser un agonista débil en arterias intrapulmonares aisladas de ratas, donde UTP fue más potente en inducir vasoconstricción sugiriendo la participación de los receptores P2Y₂ y/o P2Y₄ (Rubino et al., 1999). En general, la potencia de agonistas para los receptores P2Y es similar en arterias intrapulmonares grandes y pequeñas de rata. No obstante, a diferencia de otros nucleótidos, UTP contribuye de manera significativa a la vasoconstricción de arterias pequeñas (Chootip et al., 2002).

Los estudios mencionados se llevaron a cabo sólo en arterias intrapulmonares, sin considerar al territorio venoso en la respuesta contráctil, lo que de manera significativa podría influir en la RVP, más aún, tampoco se ha estudiado la contribución de la acción purinérgica en la fisiopatología de la HAP.

1.4.4. En Hipertensión Pulmonar

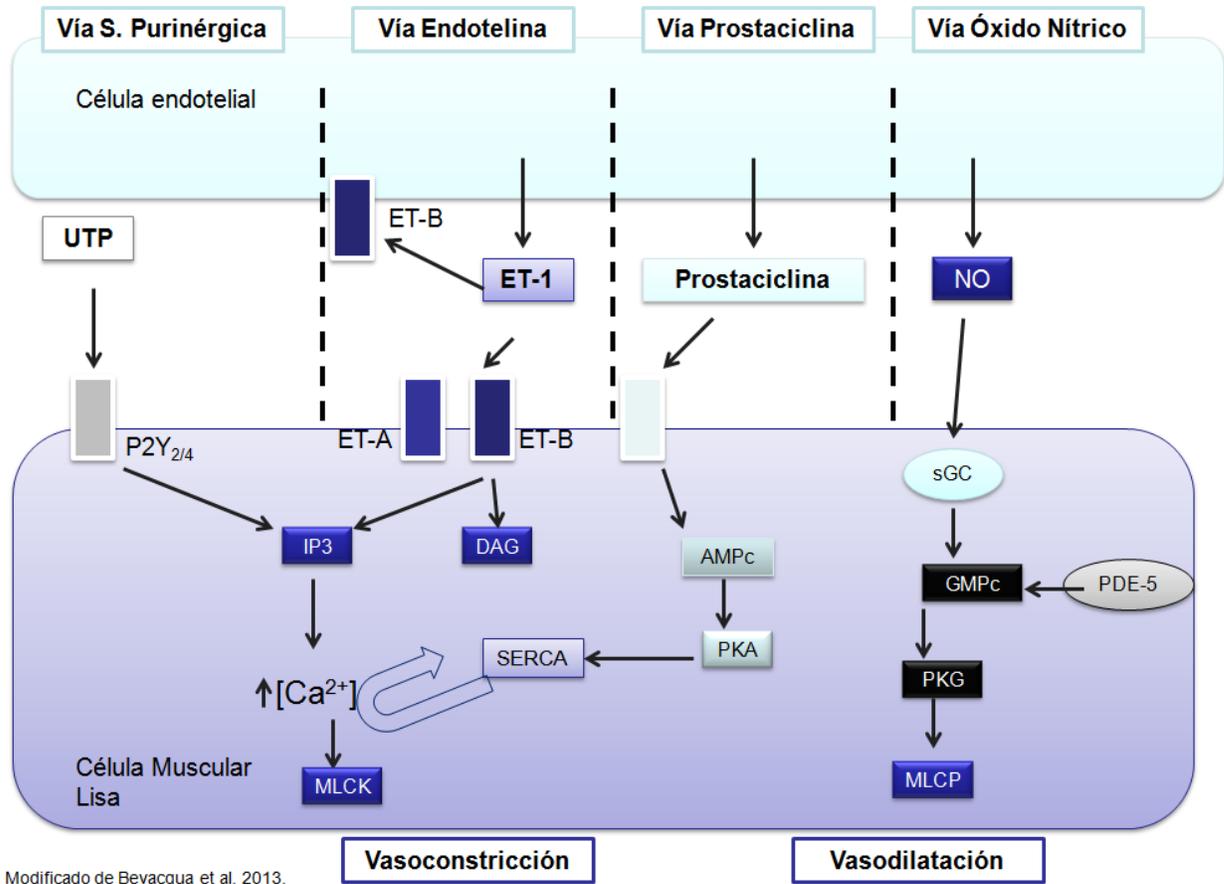
La importancia de considerar a la señalización purinérgica en la HP y la HAP se debe a que se ha descrito sobre expresión de receptores P2Y y disminución de ectonucleotidasas en quienes padecen la enfermedad. Un estudio identificó genes que participan específicamente en la fisiopatología de la HAP y no otras formas de HP, utilizando el análisis de *microarrays* de todo el genoma a partir de muestras de tejido pulmonar de sujetos con HAP, HP secundaria a fibrosis pulmonar idiopática y sujetos normales. Por medio de PCR en tiempo real confirmaron la expresión diferencial en PAH de acuerdo a sus hallazgos en *microarrays* y observaron sobre expresión de receptores purinérgicos P2Y en el tejido pulmonar de quienes padecen HAP en comparación con los sujetos con HP secundaria a fibrosis pulmonar idiopática y los controles. Este estudio muestra que la HAP se caracteriza por distintas formas de expresión génica, lo que implica mecanismos fisiopatológicos distintos (Rajkumar et al., 2010). También se ha señalado la disminución de ectonucleotidasas en quienes padecen HAP, por medio de imágenes de inmunohistoquímica de tejido pulmonar de pacientes con HAP. En comparación con los controles se observó disminución de la ectonucleotidasa CD39 (Helenius et al., 2014). La mayor disponibilidad de nucleótidos extracelulares podría relacionarse con el aumento del tono vascular y la proliferación de células musculares lisas, característico de la enfermedad.

En la actualidad existe gran interés en el potencial terapéutico de los compuestos involucrados en la señalización purinérgica en diversas condiciones

fisiopatológicas (Burnstock et al., 2006). Por ejemplo, se encuentra en marcha un ensayo clínico en fase II para el tratamiento de la tos crónica refractaria, agente con el AF-219, un antagonista para el receptor P2X₃ (Abdulqawi et al., 2015). Además ya se utilizan ampliamente en la práctica clínica el Clopidogrel, antagonista de los receptores P2Y₁₂, como anti-agregante plaquetario (Franchi et al., 2015) y la Suramina, antagonista inespecífico de receptores purinérgicos, para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana humana (Babokhov et al., 2013), entre otros (Burnstock et al., 2006).

La investigación del rol de la señalización purinérgica en la circulación venosa pulmonar podría aportar información relevante, para abordar otra vía involucrada en la fisiopatología de la HAP y abrir la posibilidad a nuevos tratamientos.

En base a los antecedentes expuestos, nos propusimos estudiar el posible rol de la señalización purinérgica como una cuarta vía involucrada en la vasoconstricción exacerbada descrita en la HAP (Figura 2).



Modificado de Bevacqua et al. 2013.

Figura 2. Señalización purinérgica como cuarta vía involucrada en la fisiopatología de la HAP (Modificado de Bevacqua et al. 2013).

2. HIPÓTESIS

“La activación de los receptores P2Y₂ y/o P2Y₄ por UTP extracelular, produce aumento en la contractilidad de venas intrapulmonares pequeñas de rata y en Hipertensión Arterial Pulmonar desencadena vasoconstricción exacerbada.”

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta vasomotora de venas intrapulmonares pequeñas inducida por UTP extracelular, por medio de receptores purinérgicos P2Y₂ y P2Y₄, en animales control y con Hipertensión Arterial Pulmonar inducida por MCT.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Objetivo Específico 1:

Estudiar la respuesta contráctil de VIP a diferentes concentraciones de UTP y comparar el EC_{50} de curvas dosis respuestas de ratas control y con HAP inducida por MCT, mediante VMCF.

4.2. Objetivo Específico 2:

Disecar farmacológicamente la contribución de los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ implicados en la contracción inducida por UTP en VIP de ratas control y ratas con HAP inducida por MCT, mediante VMCF

4.3. Objetivo Específico 3:

Demostrar la presencia de receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ en células musculares lisas y células endoteliales de VIP de ratas control y ratas con HAP inducida por MCT, por medio del uso de inmunofluorescencia indirecta:

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en un grupo de ratas control y un grupo de ratas con HAP inducida por MCT, un modelo experimental aceptado, que presenta similitudes con las características del grupo 1 de la HAP humana.

5.1. Objetivo Específico 1:

Estudiar la respuesta contráctil de VIP a diferentes concentraciones de UTP y comparar el EC_{50} de curvas dosis respuestas de ratas control y con HAP inducida por MCT, mediante VMCF:

La respuesta contráctil de VIP (100 μm – 200 μm de calibre) inducida por UTP, se caracterizó analizando el comportamiento vasomotor dependiente de la concentración de UTP, mediante estudios funcionales de VMCF que permitieron describir la cinética del efecto contráctil del agonista. Mediante esta técnica se pudo determinar el EC_{50} y la Respuesta Contráctil Máxima de UTP en ratas control y con HAP inducida por MCT.

5.2. Objetivo Específico 2:

Disecar farmacológicamente la contribución de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ implicados en la contracción inducida por UTP en VIP de ratas control y ratas con HAP inducida por MCT, mediante VMCF:

Para determinar la contribución selectiva de receptores P2Y en la respuesta contráctil de VIP (100 µm – 200 µm de calibre) inducida por UTP, se administró el nucleótido en combinación con el compuesto ARC118925XX (Tocris), un antagonista específico para el receptor P2Y₂ (Kemp et al., 2004), en estudios de VMCF. Para complementar el punto anterior, se realizaron estudios del mismo tipo, con Thio-UTP (Tocris) un agonista potente y selectivo para el receptor P2Y₂ (Jacobson et al., 2006). No se determinó directamente la contribución del receptor P2Y₄, debido a que no existe disponibilidad de compuestos que antagonicen su actividad.

5.3. Objetivo Específico 3:

Demostrar la presencia de receptores P2Y₂ y P2Y₄ en células musculares lisas y células endoteliales de VIP de ratas control y ratas con HAP inducida por MCT, por medio del uso de inmunofluorescencia indirecta:

Se utilizaron subtipos de anticuerpos específicos para los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en VIP de rebanadas de pulmón de rata, los que fueron posteriormente visualizados en microscopía confocal, con el fin de detectar su presencia en la capa media e íntima, por medio de la co-localización con α -actina, marcador específico para células musculares lisas y con el marcador específico para el Factor de Von Willebrand, que es una glucoproteína producida de forma constitutiva en el endotelio, almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade y que se une al tejido conectivo sub-endotelial (Sadler et al., 1998), permitiendo visualizar si existe presencia de estos receptores en este compartimento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Modelo de HAP inducido por MCT

Para ese estudio se utilizaron ratas de la especie Sprague Dawley provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile siguiendo un protocolo experimental que fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina (Protocolo CBA#0614 FMUCH). Para realizar la preparación de Monocrotalina (Sigma), se utilizaron 300g de este compuesto disueltos en HCl 1 N. El pH fue ajustado a 7,4 con NaOH 0.5 N y el volumen de la solución se completó con agua bidestilada para lograr una concentración de 20 mg/ml. Las ratas de ~200g recibieron una inyección subcutánea única de MCT (60 mg/kg) (Ryan et al., 2011) o un vehículo según grupo de estudio. Los experimentos se realizaron 3 semanas posteriores a la inyección de MCT o el vehículo.

6.2. Preparación de rebanadas de pulmón de rata

Las ratas fueron eutanasiadas con inyección intraperitoneal de Ketamina 180 mg/kg (Centrovet) y Xilacina 18 mg/kg (Ilium) y luego transferidas a un panel de disección quirúrgica en condiciones de asepsia de acuerdo al protocolo de bioética previamente aprobado (Protocolo CBA#0614 FMUCH). En cada animal, previa aplicación local de Etanol al 100%, se realizó una toracotomía media anterior, desde la escotadura yugular hasta el apéndice xifoideas, ampliándose en la base del tórax

hacia cada lado, con lo que se tuvo acceso amplio a ambos pulmones. Posteriormente la tráquea fue canulada con un tubo de catéter intravenoso (NIPRO) el que se fijó en la posición óptima con cinta adhesiva. Por esta vía, los pulmones colapsados fueron reclutados a capacidad pulmonar total (CPT) con la infusión de agarosa (Axygen) al 2% en HBSS (mantenida a 37°C) mediante una jeringa. Subsecuentemente los vasos intrapulmonares fueron perfundidos con solución de gelatina al 6% (Becton, Dickinson) mantenida a 37°C, a través de la arteria pulmonar, por inyección en el ventrículo derecho por medio de un catéter intravenoso (NIPRO). La agarosa y la gelatina fueron solidificadas manteniendo el cuerpo de la rata a 4°C durante 20 minutos. Los pulmones y el corazón fueron removidos del animal y mantenidos en HBSS frío. Los lóbulos pulmonares fueron separados y cortados. Cada segmento pulmonar fue transferido a un vibrátomo (Compresstome VF-300), con la base del lóbulo situado en la base de un émbolo del equipo. El segmento pulmonar fue incrustado y cubierto con gelatina 6%. Luego de que la gelatina fue solidificada en frío, el bloque se cortó en secciones seriadas de 150 μm , siendo almacenadas por un período breve en HBSS frío. Las rebanadas fueron mantenidas en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con penicilina (CALBIOCHEM) y estreptomina (SIGMA) a 37°C y CO₂ 5% en una incubadora de cultivo celular por hasta 2 días. En estas condiciones de temperatura la gelatina contenida en los vasos sanguíneos fue disuelta dejando libre el lumen para su posterior estudio (Figura 3).

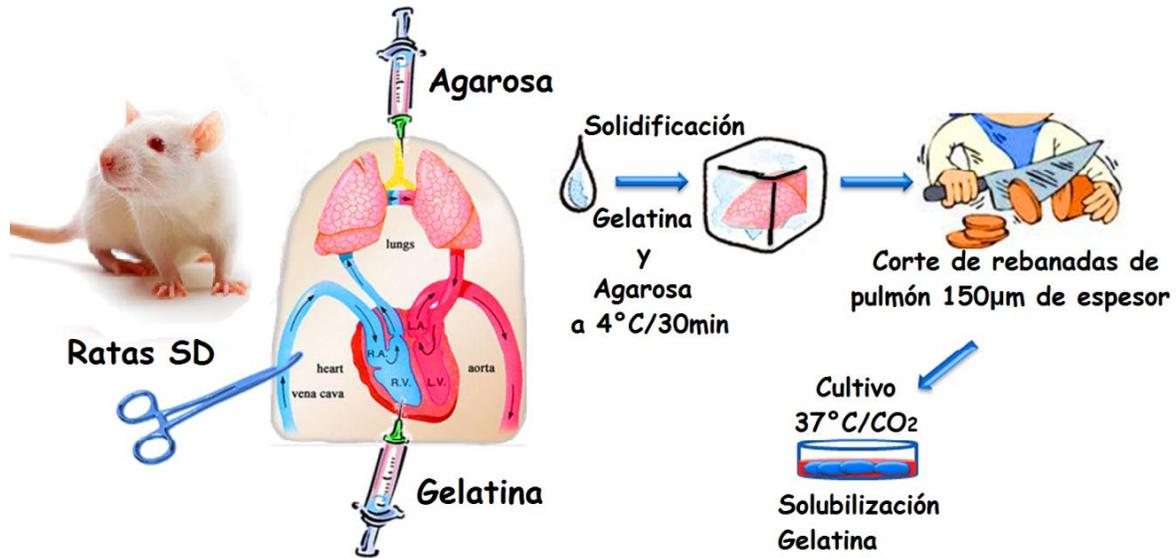


Figura 3. Esquema representativo de la preparación de rebanadas de pulmón.

El modelo experimental de rebanadas de pulmón mantiene la geometría, la disposición vascular, la integridad de la musculatura lisa, del endotelio y la retracción elástica del parénquima pulmonar. Por estas características permite estudiar un segmento vascular pulmonar en particular, conservando gran parte de sus características morfo-funcionales y de las condiciones fisiológicas que lo rodean. Lo anteriormente expuesto hace que este modelo tenga gran potencial para el estudio de enfermedades pulmonares en comparación con otros modelos experimentales utilizados en la literatura citada anteriormente para el estudio del rol de la señalización purinérgica en el tono vascular pulmonar, los cuales han sido realizados en anillos vasculares, midiendo la tensión generada en respuesta a agentes vasoactivos, sin considerar las posibles interacciones con estructuras vecinas.

6.3. Venas Intrapulmonares en rebanadas de pulmón de rata

Los vasos sanguíneos pulmonares forman una serie de ramificaciones en el pulmón que comienzan en el ventrículo derecho, desde la división de la arteria pulmonar con dos ramas, una para cada pulmón. A continuación, las arterias intrapulmonares siguen la ramificación de las vías aéreas hasta llegar a los capilares situados en el parénquima alveolar que permite el intercambio gaseoso. A diferencia de las arterias, las venas intrapulmonares no están asociadas a las vías respiratorias en su camino hacia el atrio izquierdo y están rodeados de parénquima pulmonar (Fraser 2005). Si bien se puede observar bronquiólos aislados en la rebanada de pulmón, son distinguibles de estructuras vasculares por la presencia de cilios, y el batido mucociliar se mantiene en la rebanada *ex vivo* de pulmón. La distribución y características morfológicas de la circulación pulmonar y las vías aéreas, permite reconocer las venas intrapulmonares en las rebanadas de pulmón (Figura 4). Cuando se selecciona una VIP para los estudios de VMCF debe ser transversal a la superficie de la rebanada de pulmón (Figura 4).

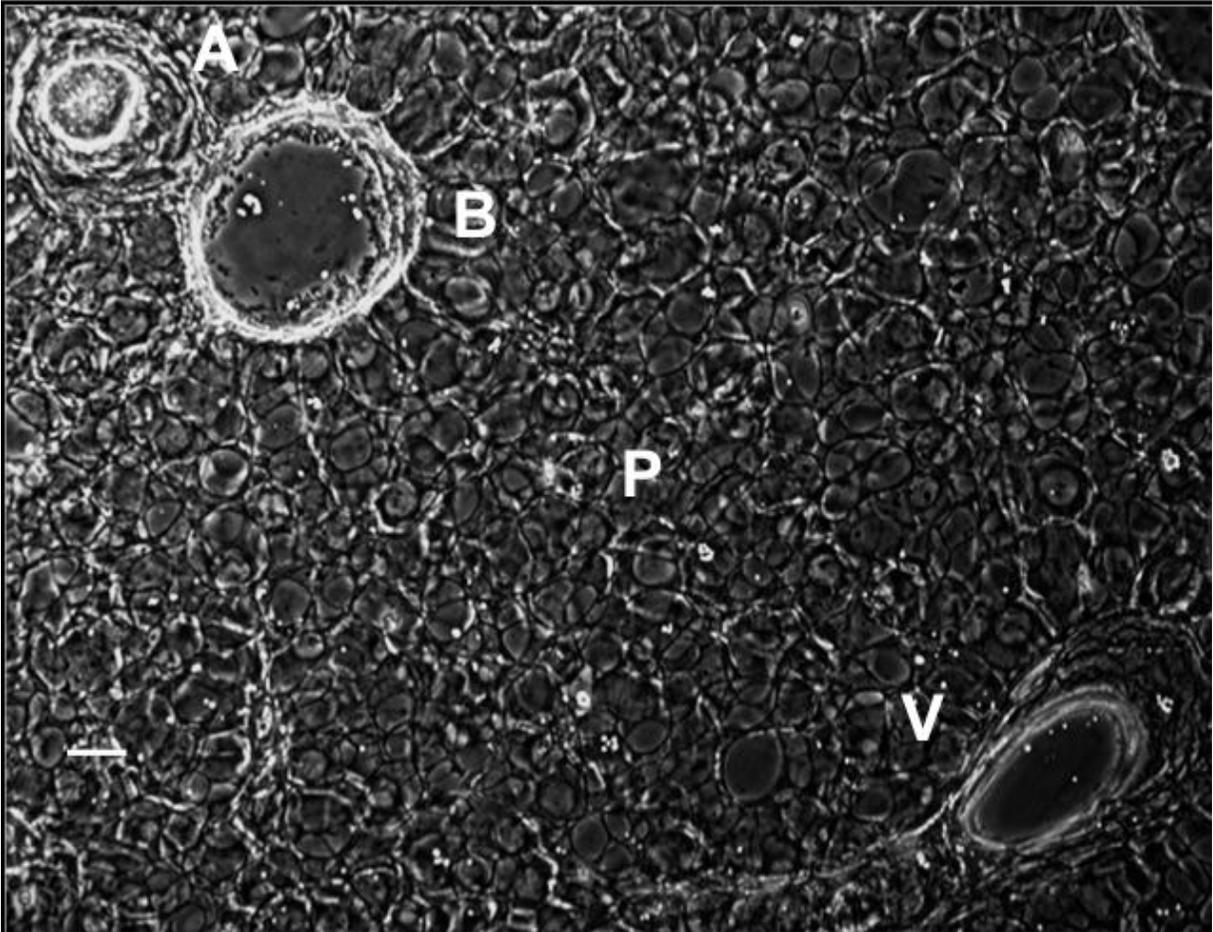


Figura 4 Fotografía de una rebanada de pulmón en VMCF. Se observa la presencia de bronquíolo (B), arteria intrapulmonar pequeña (A) parénquima pulmonar (P) y venas intrapulmonares pequeñas (V). Barra = 100 μ m.

6.4. Medición de contracción de venas intrapulmonares pequeñas

Las rebanadas de pulmón fueron montadas en un “porta objetos” de 25,4 x 76,2 mm y mantenidas en el lugar con una pequeña lámina de malla de nylon con un agujero centrado sobre el vaso intrapulmonar de interés. Un cubre objetos fue colocado sobre la rebanada de pulmón montada, con bordes laterales de silicona para crear una delgada cámara rectangular. La rebanada de pulmón fue perfundida en un extremo de la delgada cámara y la solución fue removida por un sistema de succión en el extremo opuesto. La cámara de perfusión fue montada en un microscopio de contraste de fase invertido y fotografiada con un objetivo 25X. Imágenes digitales de (640 x 800 pixeles) fueron grabadas en un lapso de tiempo (0,5 Hz) usando una cámara CCD y software para la adquisición de imágenes (S-Viewer). El área del lumen de los vasos intrapulmonares fue calculado usando el software FIJI permitiendo distinguir la región de interés del tejido aledaño por una serie de funciones para el procesamiento de la imagen, incluyendo filtros, umbral de escala de grises y binarización, seguido del cálculo del área de sección transversal del lumen por sumatoria de pixeles. El área del lumen fue normalizada al área previa a la estimulación usando Excel (Microsoft), y los cambios en el lumen fueron trazados *versus* el tiempo usando el Software Origin (Microcal). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

6.5. Inmunofluorescencia indirecta

Las rebanadas de pulmón fueron lavadas con PBS 1X (Winkler). Después de la remoción de PBS, las rebanadas se fijaron con 500 μ L de acetona (100%) (Winkler) fría por 30 minutos a -20°C . Luego fueron incubadas con solución de bloqueo que contiene Albúmina de Suero Bovino (BSA) 3% en PBS 1X por 2 horas a temperatura ambiente. Tras ello, fueron incubadas en solución de permeabilización que contiene Tritón X-100 (SIGMA) 0.1% en BSA (3%) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubadas de forma independiente en los anticuerpos primarios específicos anti receptor P2Y_2 (Rabbit) (Alomone) y anti receptor P2Y_4 (Goat) (Santa Cruz) diluidos ambos 1:300 en BSA 3% toda la noche a 4°C . Luego las rebanadas fueron incubadas de manera independiente con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 Goat anti Rabbit (Life Technologies) y Alexa Fluor 488 Donkey anti Goat (Life Technologies) ambos diluidos 1:500 en BSA 3% por dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Consecutivamente se incubaron de manera independiente con los anticuerpos primarios anti actina de células musculares lisas (Mouse) (Santa Cruz) y anti Factor de Von Willebrand (Mouse) (Santa Cruz) diluidos en BSA 3%, 1:250 y 1:100 respectivamente, toda la noche a 4°C en oscuridad. Luego las rebanadas fueron incubadas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 633 Rabbit anti Mouse (Life Technologies) por dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente las rebanadas fueron montadas usando medio de montaje ProLong con DAPI (Life Technologies) y mantenidas a 4°C hasta su estudio en un Microscopio Confocal. Entre cada uno de los pasos mencionados se realizaron 2 lavados de dos minutos con PBS 1X.

6.6. Análisis Estadístico

Los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm error estándar. Los datos se analizaron por medio de la Prueba t de Student, la Prueba de los rangos pareados de Wilcoxon y el F-test para el análisis de curvas-dosis respuesta. Se utilizó el software Origin (OriginLab Corporation) para realizar estos análisis. Se consideró una significancia estadística con un $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Control de Modelo de HAP-MCT

7.1.1. Tiempo de Aceleración Pulmonar (PAAT)

En humanos existe buena correlación entre las variables pulmonares hemodinámicas medidas por ecocardiografía y las medidas por cateterismo cardíaco. Esto también ocurre en modelos murinos de hipertensión pulmonar. La variable que cuantifica la ecocardiografía es el tiempo de aceleración pulmonar, que se relaciona indirectamente con la PAP (Mam et al., 2010). El tiempo de aceleración pulmonar (PAAT) se define como el tiempo desde el comienzo del flujo pulmonar hasta el peak de velocidad del flujo medido por ecocardiografía, y estima la presión sistólica ventricular derecha. El fundamento de esta medición es que debido a un aumento en la presión sistólica de la arteria pulmonar, las válvulas tienden a cerrarse prematuramente, y el peak de la velocidad del flujo es alcanzado en menor tiempo. Por lo tanto, el PAAT disminuye a medida que la presión de arteria pulmonar aumenta.

En la Figura 5 se gráfica el promedio y error estándar de la medición semanal del TAAP por medio de ecocardiografía, en 8 ratas control y 8 ratas tratadas con MCT. Se observa que en las ratas con HAP-MCT existe una clara tendencia a disminuir el PAAT en las 4 semanas posteriores a la inyección con MCT, comparado con las controles. Esto confirma que las ratas tratadas con MCT, entre la 3 y 4 semana post inyección presentan un aumento de la PAP.

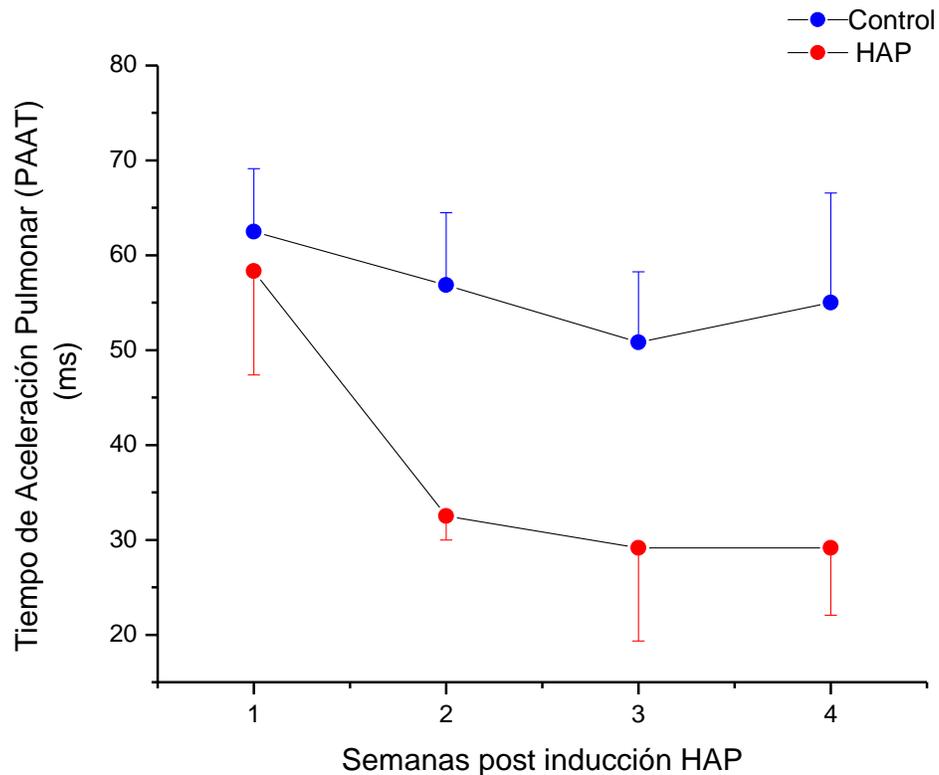


Figura 5. Control de PAAT en 8 ratas control y 8 ratas con HAP-MCT durante 4 semanas posterior a la inyección con MCT o vehículo.

7.1.2. Índice de Fulton

La hipertrofia ventricular derecha es consecuencia de la HAP. El índice de Fulton se define como la razón entre el peso del ventrículo derecho y la suma del peso del ventrículo izquierdo más el septum, por lo que permite cuantificar esta consecuencia de la HAP (Urboniene et al., 2010)

En la Figura 6 se muestra la cuantificación del Índice de Fulton del grupo de ratas

control y con HAP. Se observa que en las ratas tratadas con MCT hay un aumento significativo en el Índice de Fulton en comparación con las ratas control ($p < 0,05$), demostrando la presencia de hipertrofia ventricular derecha en las ratas con HAP-MCT. Esto válida que nuestro modelo réplica lo descrito en la literatura sobre el modelo de rata tratada con MCT.

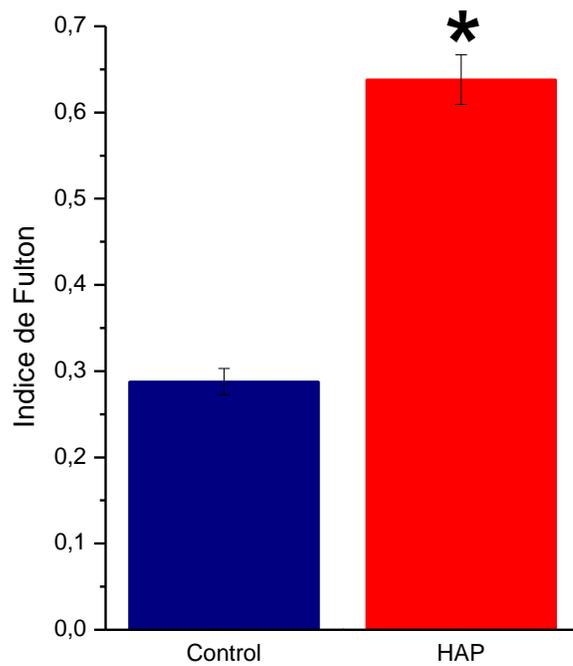


Figura 6. Control de Índice de Fulton en ratas control y ratas con HAP-MCT.

7.2. Respuesta contráctil de VIP en respuesta a UTP

La obtención de las imágenes por medio de VMCF permite visualizar la reducción del lumen de VIP como respuesta vasoconstrictora, al ser perfundidas con UTP. En la Figura 7 se observa esta respuesta, en reposo antes de la perfusión con UTP (A), durante la perfusión con solución salina de Hanks. Cuando se agrega UTP a la perfusión, el lumen de la VIP en estudio disminuye (B). La captura de estas imágenes en VMCF nos permite estudiar la respuesta contráctil inducida por UTP en VIP en rebanadas de pulmón de rata.

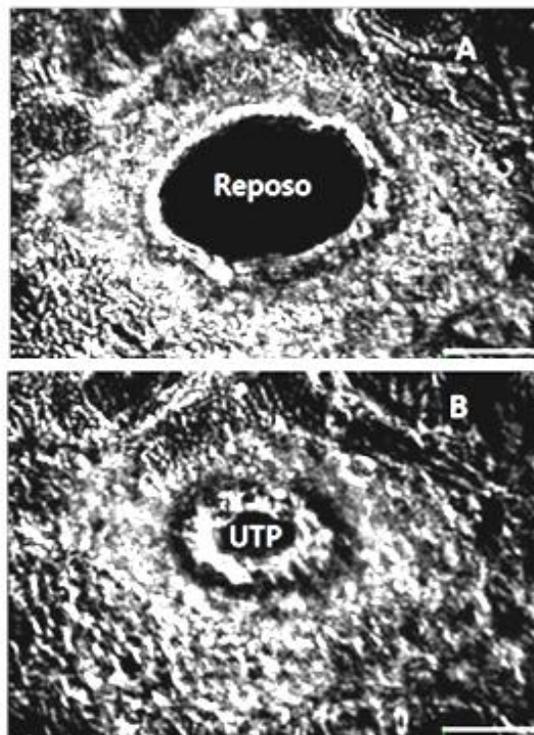


Figura 7. Actividad Contráctil inducida por la perfusión de UTP en una VIP.

Imagen de VIP obtenida en VMCF en reposo durante la perfusión de solución salina de Hanks (A) y posterior a la perfusión con UTP (B), muestra una disminución en el lumen. Barra = 50 μ m.

El análisis de imágenes obtenidas en VMCF permite graficar la cinética de la contracción inducida por diferentes concentraciones del nucleótido (0,1, 1, 10, 100 y 1000 μM) de manera continua (Figura 8).

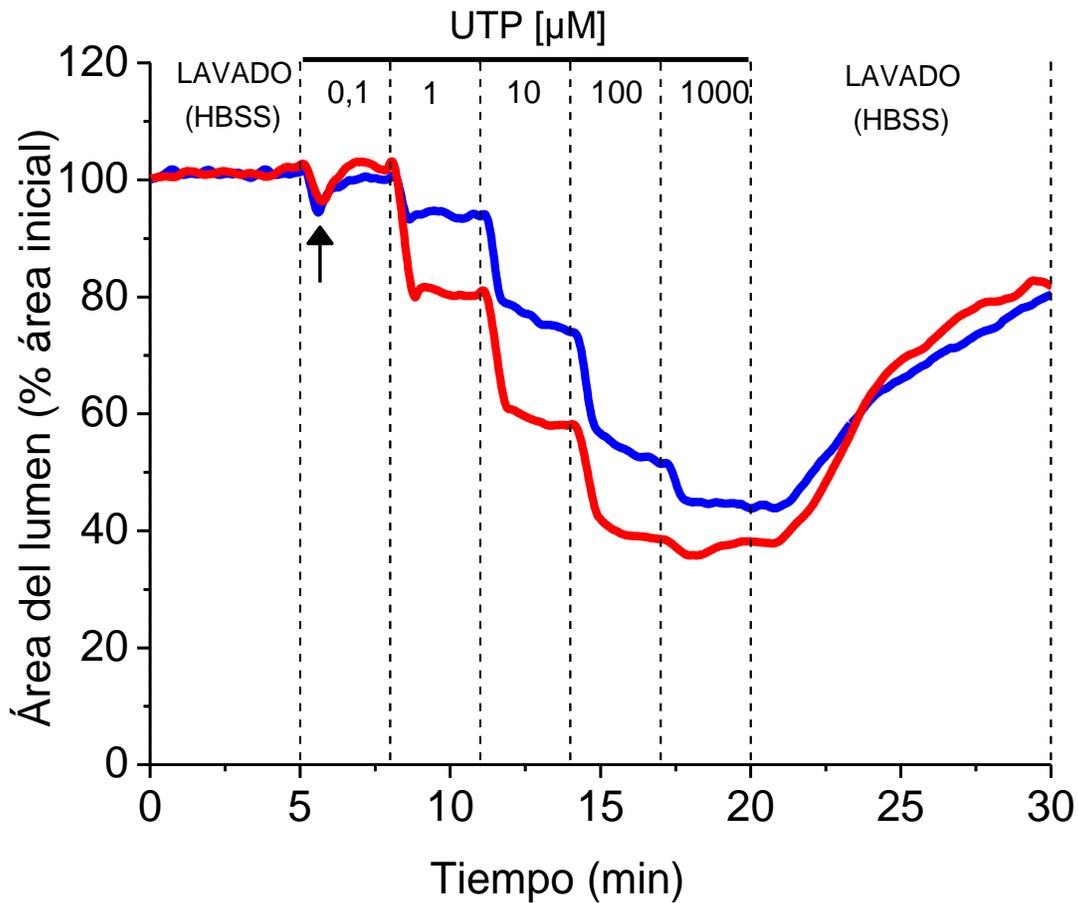


Figura 8. Gráficos de la cinética de la respuesta contráctil inducida por UTP en una VIP de una rata Control (trazado azul) y una de una con HAP-MCT (trazado rojo), a diferentes concentraciones del nucleótido. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial (eje y), en el tiempo durante la perfusión con UTP a concentraciones de 0,1, 1, 10, 100 y 1000 μM de manera continua.

La respuesta contráctil de una VIP del grupo control se representa en la Figura 8 (trazado azul). Al perfundir con UTP 0,1 μM se observa una disminución del área del lumen de un $\sim 4\%$ en relación al calibre inicial, y esta respuesta es transitoria, vuelve a un calibre similar al inicial, a pesar de la presencia de la perfusión con el nucleótido a esa concentración. En una VIP de una rata con HAP (trazado rojo), se observa una disminución del lumen de magnitud similar a la observada en el control y también es transitoria, retornando al lumen inicial, a pesar de que continúa la perfusión con UTP 0,1 μM .

En presencia de UTP 1 μM en la VIP control se observa una respuesta contráctil de un $\sim 8\%$ y en la VIP con HAP de un $\sim 21\%$. En ambos casos la disminución del lumen no es transitoria, si no que es constante. Esto responde a la definición del tono vascular como un equilibrio entre los estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores (Webb et al., 1981), en este caso se alcanza un estado donde predomina el estímulo vasoconstrictor de UTP produciendo un equilibrio, lo que se observa como una meseta en el gráfico de la cinética contráctil. Cuando se perfunde con 10 μM de UTP la VIP control muestra una disminución del lumen de un $\sim 26\%$ y la VIP con HAP de un $\sim 43\%$, en ambos casos se observa una tendencia a estabilizar la respuesta contráctil, sin embargo sólo la cinética de la VIP con HAP muestra una meseta en su respuesta. Se debe considerar que el tiempo de perfusión para cada concentración fue de 3 minutos de acuerdo a los hallazgos en experimentos previos del laboratorio.

Durante la perfusión con 100 μM vemos un comportamiento similar y la respuesta contráctil en la VIP Control es de un $\sim 48\%$ y en la VIP con HAP es de un $\sim 62\%$. La máxima concentración utilizada para realizar los gráficos que describen la

respuesta contráctil fue 1000 μM . A esta concentración se observa una respuesta contráctil de un $\sim 57\%$ en la VIP Control y de un $\sim 66\%$ en la VIP con HAP. La respuesta a concentraciones sobre 10 μM es dependiente de la presencia del nucleótido, ya que durante el lavado con solución salina de Hanks (HBSS), el lumen comienza a recuperar su calibre, sin embargo no alcanza su diámetro basal, por lo tanto, esta respuesta es parcialmente reversible.

Si bien estos gráficos son representativos en la magnitud de la respuesta contráctil observada en cada grupo, existe variabilidad en la cinética observada en ambos grupos, ya que algunas VIP alcanzan la respuesta contráctil máxima inducida por la perfusión del nucleótido y retornan a un calibre mayor, a pesar de la presencia de UTP. Otras VIP alcanzan la respuesta máxima contráctil para una concentración dada, alcanzando una meseta sin reversibilidad.

Se cuantificaron los experimentos de 6 ratas control y de 8 ratas con HAP-MCT, y se midió la máxima disminución del lumen que produce cada concentración de UTP como lo ilustrado en la Figura 8. Se obtuvo el promedio y error estándar para cada concentración en cada grupo y se realizó la Prueba t de Student para muestras independientes, para evaluar si existía diferencia significativa (Figura 9 a 13).

La Figura 9 muestra el promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 0,1 μM en el grupo de ratas Control y del grupo de ratas con HAP-MCT, expresada como porcentaje de vasoconstricción. Si bien hay mayor actividad contráctil inducida por UTP en el grupo de ratas con HAP-MCT, $8,0 \pm 2,9\%$ *versus* $1,8 \pm 0,9\%$ en el grupo control, no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

El promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 1 μM se presenta en la Figura 10. También se observa mayor actividad contráctil inducida por UTP 1 μM , en el grupo de ratas con HAP-MCT ($20,8\pm 5,2\%$) que en el grupo control ($8,4\pm 4,0\%$) pero la diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa.

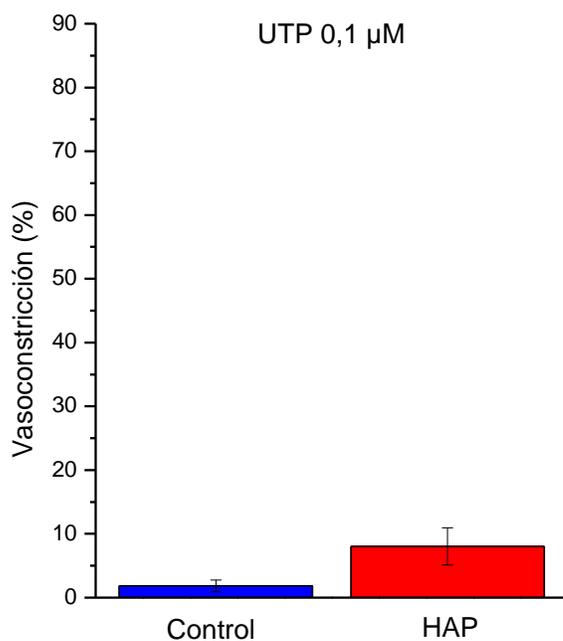


Figura 9. Gráfico comparativo del promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 0,1 μM en el grupo de ratas Control (barra azul) (n=6) y del grupo de ratas con HAP-MCT (n=8) (barra roja), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP en el grupo control es de $1,8\pm 0,9\%$ y en el grupo de ratas con HAP-MCT es de $8,0\pm 2,9\%$.

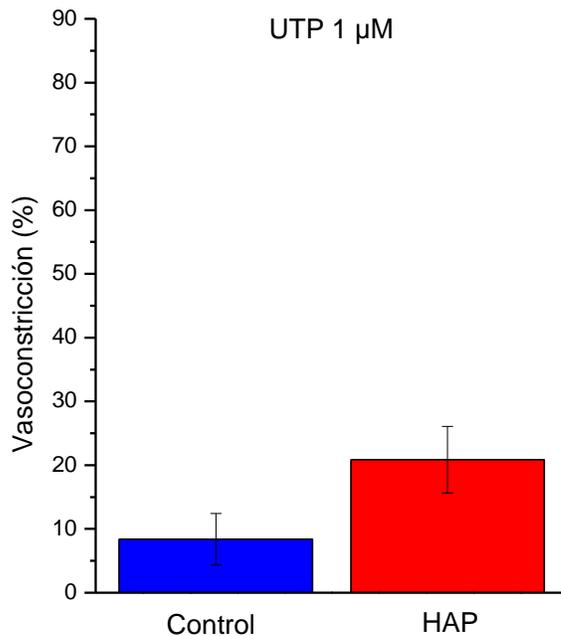


Figura 10. Gráfico comparativo del promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 1 μ M en el grupo de ratas Control (barra azul) (n=6) y del grupo de ratas con HAP-MCT (n=8) (barra roja), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP en el grupo control es de 8,4 \pm 4,0% y en el grupo de ratas con HAP-MCT es de 20,8 \pm 5,2.

Cuando se perfunde con 10 μ M de UTP el promedio de la vasoconstricción es mayor en las ratas con HAP-MCT que en las control, 43,2 \pm 4,1% y 26,6 \pm 5,1% respectivamente, y existe diferencia estadísticamente significativa en la respuesta contráctil inducida por UTP a esta concentración entre ambos grupos ($p < 0,05$) (Figura 11).

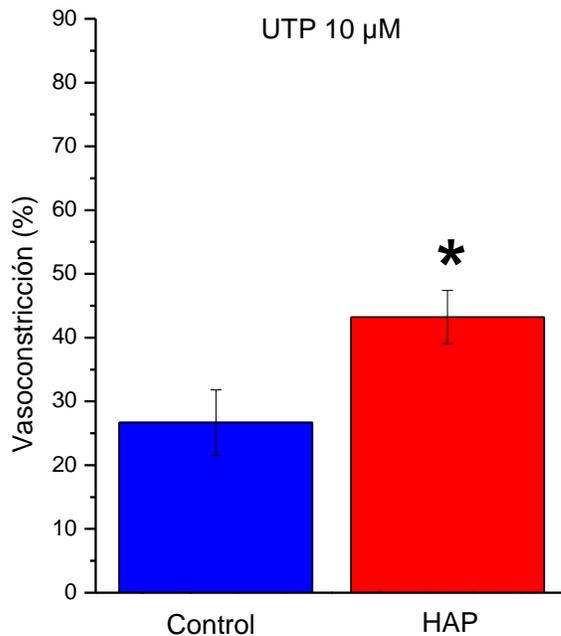


Figura 11. Gráfico comparativo del promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 10 μM en el grupo de ratas Control (barra azul) (n=6) y del grupo de ratas con HAP-MCT (n=8) (barra roja), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP en el grupo control es de $26,6 \pm 5,1\%$ y en el grupo de ratas con HAP-MCT es de $43,2 \pm 4,1\%$. (* $p < 0,05$).

También se observa mayor actividad contráctil inducida por UTP 100 μM en el grupo de ratas con HAP-MCT ($71,5 \pm 4,3\%$) que en el grupo control ($56,1 \pm 1,7\%$), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 12). En la Figura 13 se observa que la actividad contráctil inducida por UTP 1000 μM , tiende a

ser mayor en el grupo de ratas con HAP-MCT ($76,8 \pm 4,8\%$) que en el grupo control ($65,6 \pm 3,8\%$) pero la diferencia no es estadísticamente significativa

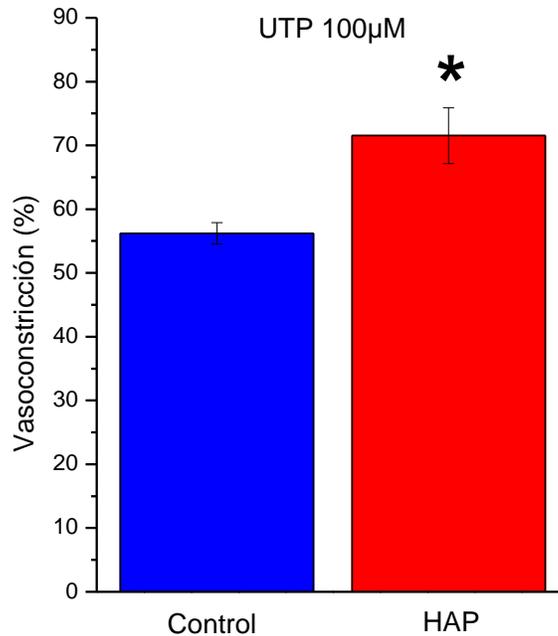


Figura 12. Gráfico comparativo del promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 100 µM en el grupo de ratas Control (barra azul) (n=6) y del grupo de ratas con HAP-MCT (n=8) (barra roja), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP en el grupo control es de $56,1 \pm 1,7\%$ y en el grupo de ratas con HAP-MCT es de $71,5 \pm 4,3\%$. (* $p < 0,05$).

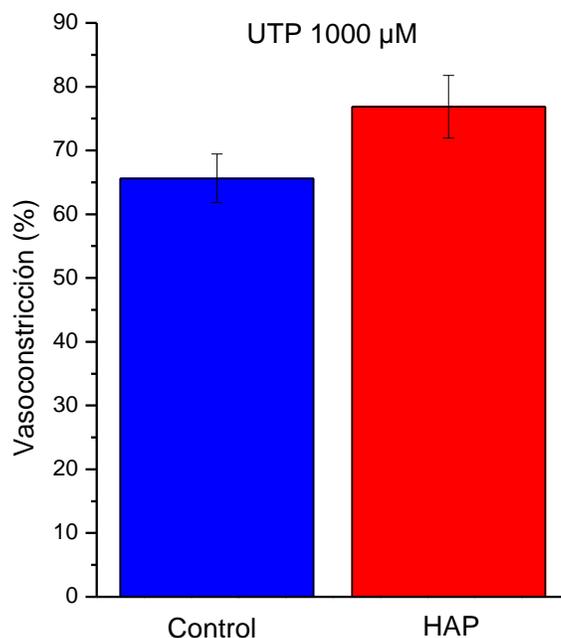


Figura 13. Gráfico comparativo del promedio de la respuesta contráctil inducida por UTP a una concentración de 1000 μ M en el grupo de ratas Control (barra azul) (n=6) y del grupo de ratas con HAP-MCT (n=8) (barra roja), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP en el grupo control es de 65,6 \pm 3,8% y en el grupo de ratas con HAP-MCT es de 76,8 \pm 4,8%.

Si bien en el análisis individual de la comparación de los promedios de la respuesta contráctil inducida por cada concentración de UTP, muestra una clara tendencia a que la respuesta de las VIP de las ratas con HAP-MCT es mayor que en

las VIP de las ratas controles, sólo a concentraciones de 10 y 100 µM del nucleótido la diferencia es significativa ($p < 0,05$) (Figura 11 y 12).

La respuesta contráctil obtenida, fue además analizada en su comportamiento global y comparada entre los grupos. Para esto se realizó la construcción de curvas dosis-respuesta para ambos grupos por medio de un ajuste para modelos sigmoidales en el software OriginPro8.1, con la función “Dosis Respuesta” que utiliza la siguiente ecuación:

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(LOGx0 - x)p}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo:

- A1: asíntota inferior.
- A2: asíntota superior
- LOGx0: centro
- p : pendiente.

El ajuste para las curvas, informa parámetros derivados, entre esos la respuesta máxima y el EC_{50} para cada grupo. La Curva dosis respuesta del grupo control arroja un EC_{50} de $16,0 \pm 1,1$ µM con una Respuesta Contráctil máxima de $65,6 \pm 3,8\%$, mientras que el grupo de VIP de ratas con HAP-MCT un EC_{50} de $8,8 \pm 1,4$ µM y una respuesta máxima de $76,8 \pm 4,8$ (Figura 14). La diferencia entre los EC_{50} de ambos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Al observar la gráfica del comportamiento de ambas curvas, se encontró que el comportamiento global de las VIP de ratas con HAP (curva roja) muestra una respuesta contráctil mayor que las VIP de las ratas control (curva azul), ya que la primera está desplazada hacia arriba más que hacia la izquierda. Esto sugiere que la diferencia entre ambos grupos no se debe a mayor afinidad por el nucleótido, si no que la respuesta entre ambos grupos varía. Si bien, estos resultados no explican los mecanismos involucrados en el aumento de la actividad contráctil de las VIP de ratas con HAP-MCT, confirman que existe vasoconstricción exacerbada en el grupo de ratas tratadas con MCT, lo que confirma la hipótesis planteada.

Además se realizó la comparación del conjunto de datos de cada curva Dosis Respuestas mediante el *Test F*. De este análisis se obtiene una diferencia estadísticamente significativa entre el comportamiento global de ambos grupos (Figura 14) ($p < 0,05$).

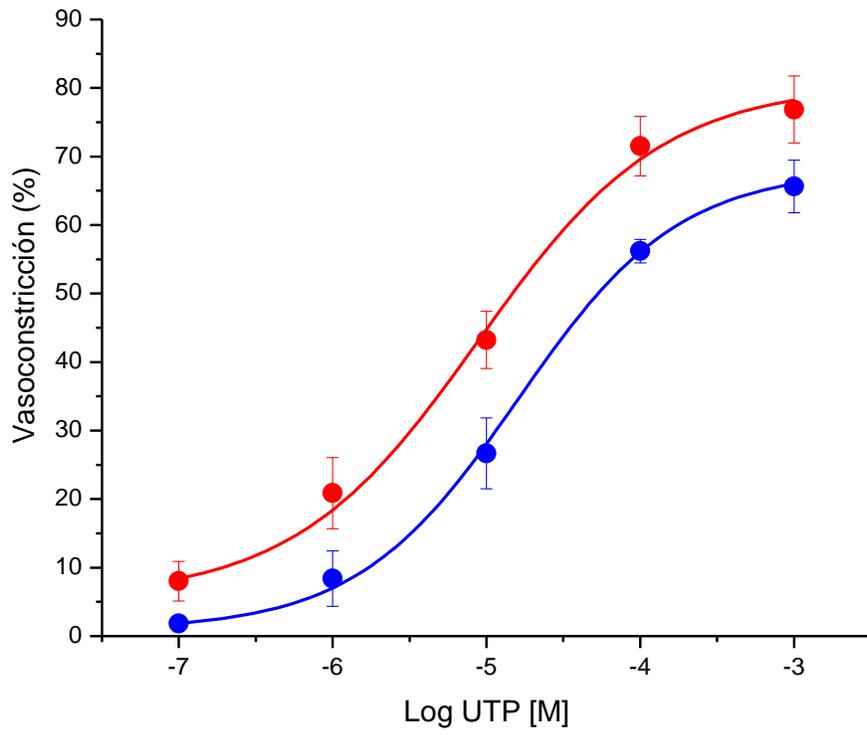


Figura 14. Curvas dosis respuesta de VIP de ratas Control (n=6) (línea azul) y con HAP-MCT (n=8) (línea roja). ($p < 0,05$)

7.3. Contribución de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en la contracción inducida por UTP

Se realizaron experimentos en VMCF con UTP, Thio-UTP (un agonista de alta afinidad por el receptor P2Y₂) (Jacobson et al., 2006, Ko et al., 2008) y AR-C118925XX (antagonista específico para el receptor P2Y₂) (Meghani et al., 2002, Kemp et al., 2004) para estudiar la contribución de los receptores P2Y (P2Y₂ y/o P2Y₄) implicados en la respuesta contráctil inducida por UTP. En la Figura 15 se muestra un experimento sobre la inhibición de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por UTP en una VIP del grupo control. En la gráfica de la cinética de la contracción, se observa una disminución del lumen de un ~80% en presencia de UTP 20 µM. Posterior a la contracción de la VIP se realizó el lavado por 10 minutos con HBSS y luego se inició el pre tratamiento con el antagonista AR-C118925XX a una concentración de 10 µM por 30 minutos. Se realizaron los experimentos con el antagonista a esa concentración, ya que es el límite superior de la concentración del mismo donde se ha descrito que existe especificidad por el receptor P2Y₂ y por el tiempo descrito en la literatura para su uso (Kemp et al., 2004). Se reinició la perfusión con UTP 20 µM durante los últimos 3 minutos del tratamiento con el antagonista para evaluar su efecto en la respuesta contráctil, observándose una disminución del lumen de un ~28%, por lo tanto, existe una inhibición parcial de la respuesta contráctil en presencia del antagonista AR-C118925XX.

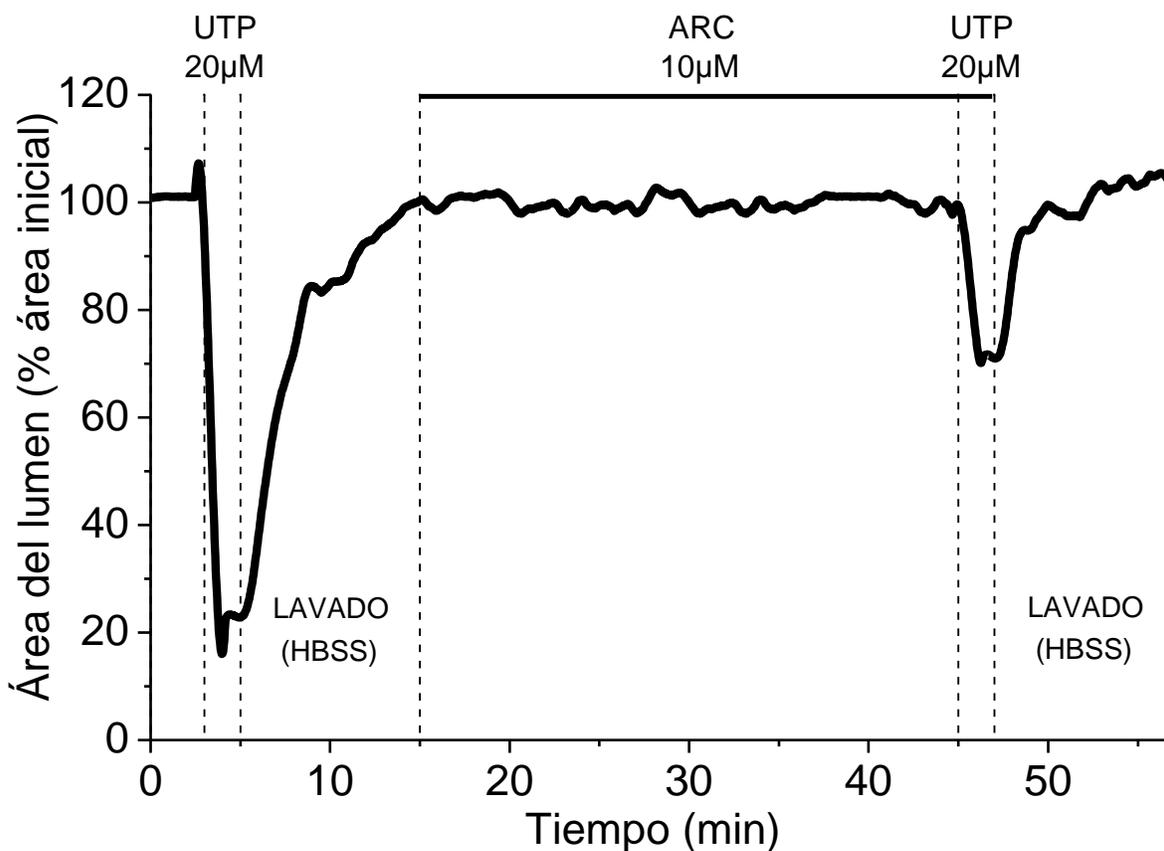


Figura 15. Gráfico de la cinética del efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por UTP en una VIP Control. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial (eje y), en el tiempo durante la perfusión con UTP 20 μM y AR-C118925XX 10 μM .

En la Figura 16 se muestra la cuantificación de los experimentos de perfusión con UTP 20 μM post AR-C118925XX de (n=4). Se observa que AR-C118925XX inhibe de manera parcial el efecto contráctil de UTP (~45%), sin embargo este efecto no es estadísticamente significativo al compararlo con la contracción inducida por UTP aislado.

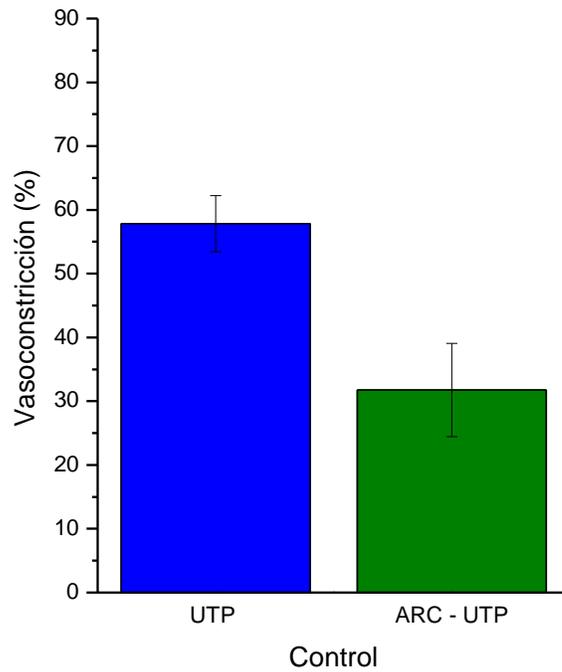


Figura 16. Gráfico de la cuantificación de los experimentos sobre el efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por UTP en VIP del grupo control (n=4), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP (barra azul) es $57,8 \pm 4,3\%$, y posteriormente, en presencia del antagonista AR-C118925XX (barra verde) es de $31,7 \pm 7,3\%$.

En la Figura 17 se observa la gráfica de la cinética de contracción al perfundir con Thio-UTP un agonista con alta afinidad por el receptor P2Y₂(Andrei A. Ivanova 2007). La presencia de Thio-UTP a una concentración de 10 µM produce una disminución del lumen de un ~38%. Posterior a la contracción de la VIP se realizó el lavado por 10 minutos con HBSS y luego se inició el pre tratamiento con el antagonista AR-C118925XX a una concentración de 10 µM por 30 minutos.

Se reinició la perfusión con Thio-UTP 10 µM durante los últimos 3 minutos del tratamiento con el antagonista para evaluar su efecto en la respuesta contráctil y se observa una disminución del lumen de un ~5%, por lo tanto, se observa una inhibición casi completa de la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en presencia del antagonista AR-C118925XX.

En la Figura 18 se muestra la cuantificación de los experimentos de perfusión con Thio-UTP (n=3). Se observa que AR-C118925XX antagoniza aproximadamente el 80% de la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en este grupo, información consistente con lo descrito en la afinidad del agonista por el receptor P2Y₂ y la selectividad del antagonista.

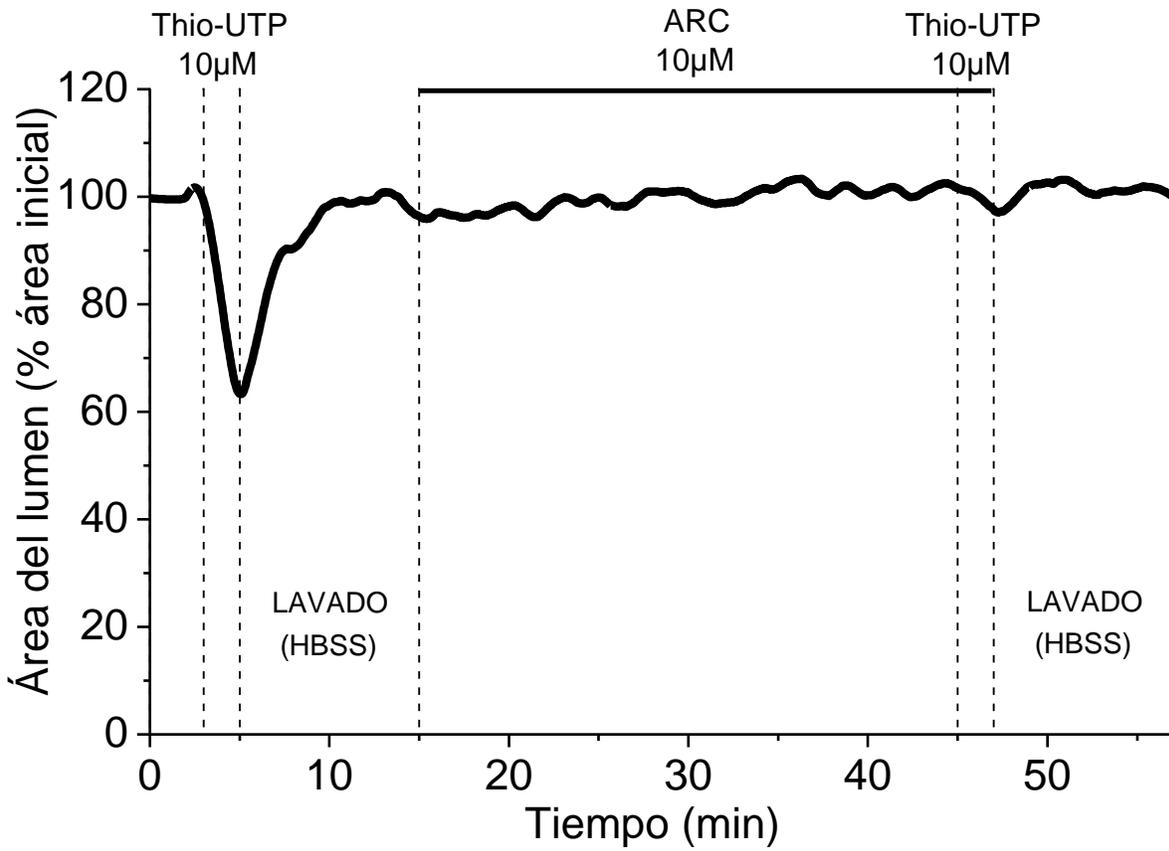


Figura 17. Gráfico de la cinética del efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en una VIP Control. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial (eje y), en el tiempo durante la perfusión con Thio-UTP 10 µM y ARC118925XX 10 µM.

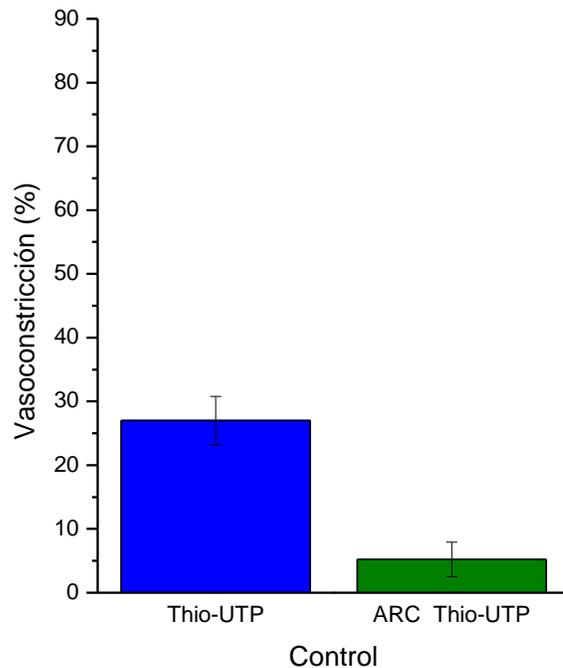


Figura 18. Gráfico de la cuantificación de los experimentos sobre el efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en VIP del grupo control (n=3), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por Thio-UTP (barra azul) es $27,0 \pm 3,7\%$, y posteriormente, en presencia del antagonista AR-C118925XX (barra verde) es de $5,2 \pm 2,6\%$.

Se realizó el mismo tipo de experimentos en VMCF, pero en VIP provenientes de ratas con HAP-MCT. En la Figura 19 se observa la gráfica de la cinética de contracción al perfundir con UTP 10 μ M. El nucleótido produce una disminución del lumen de un ~32%. Posterior a la contracción de la VIP se realizó el lavado por 10 minutos con HBSS y luego se inició el pre tratamiento con el antagonista AR-C118925XX a una concentración de 10 μ M por 30 minutos. Se reinició la perfusión con UTP 10 μ M durante los últimos 3 minutos del tratamiento con el antagonista para evaluar su efecto en la respuesta contráctil y se observa una disminución del lumen de un ~18%. En la cuantificación de estos experimentos de VIP de ratas con HAP-MCT, AR-C118925XX no genera inhibición significativa sobre la respuesta contráctil inducida por UTP (Figura 20).

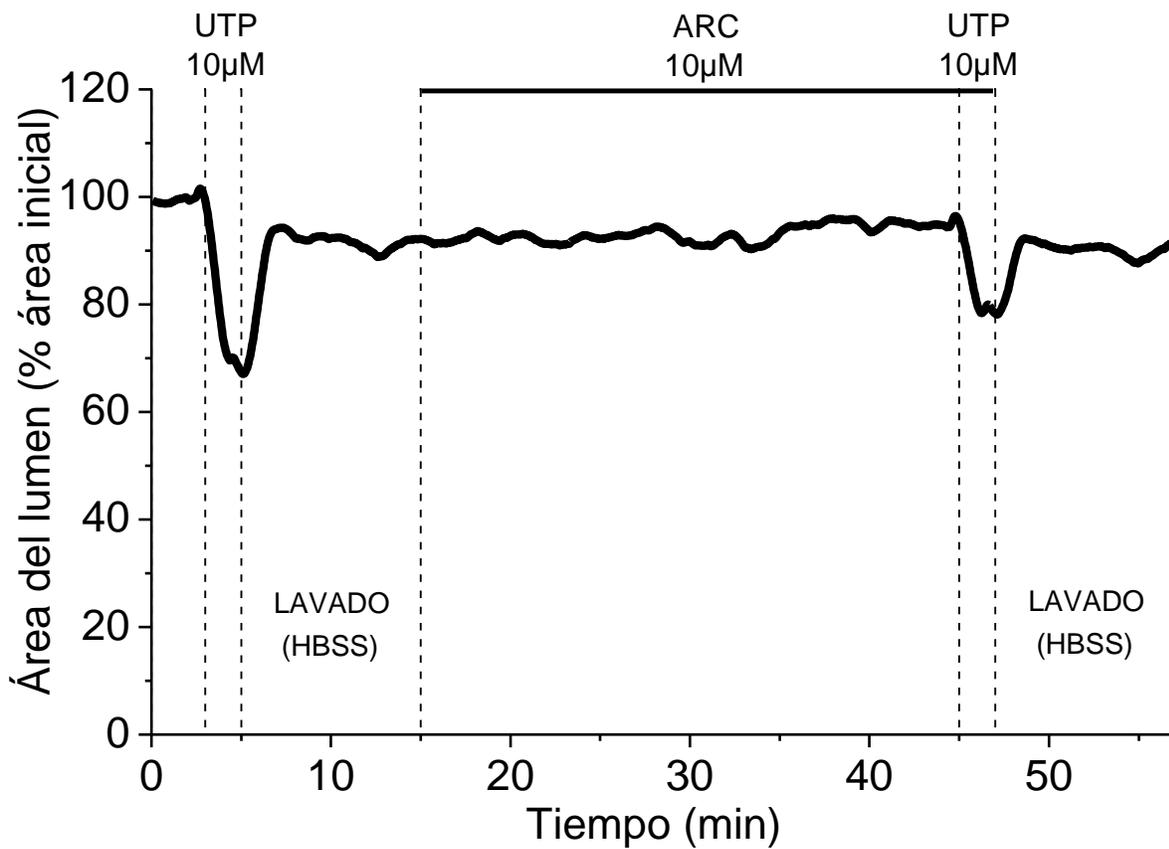


Figura 19. Gráfico de la cinética del efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por UTP en una VIP de una rata con HAP-MCT. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial (eje y), en el tiempo durante la perfusión con UTP 10 μM y AR-C118925XX 10 μM.

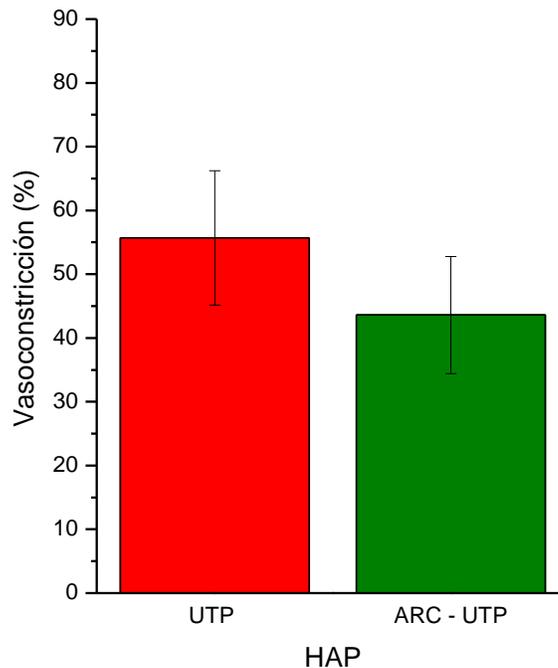


Figura 20. Gráfico de la cuantificación de los experimentos sobre el efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por UTP en VIP del grupo de ratas con HAP-MCT (n=5), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio y error estándar del porcentaje de la actividad contráctil inducida por UTP (barra roja) es $55,7 \pm 10,5\%$, y posteriormente, en presencia del antagonista AR-C118925XX (barra verde) es de $43,6 \pm 9,1\%$.

En la Figura 21 se observa la gráfica de la cinética de contracción al perfundir con Thio-UTP $10 \mu\text{M}$. El nucleótido produce una disminución del lumen de un $\sim 75\%$. Posterior a la contracción de la VIP se realizó el lavado por 10 minutos con HBSS y luego se inició el pre tratamiento con el antagonista AR-C118925XX a una concentración de $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos. Se reinició la perfusión con Thio-UTP $10 \mu\text{M}$

durante los últimos 3 minutos del tratamiento con el antagonista para evaluar su efecto en la respuesta contráctil y se observa una disminución del lumen de un ~76%. En la Figura 22 se observa la cuantificación de los experimentos de AR-C118925XX sobre la respuesta contráctil inducida por UTP, en VIP de ratas con HAP-MCT (Figura 22).

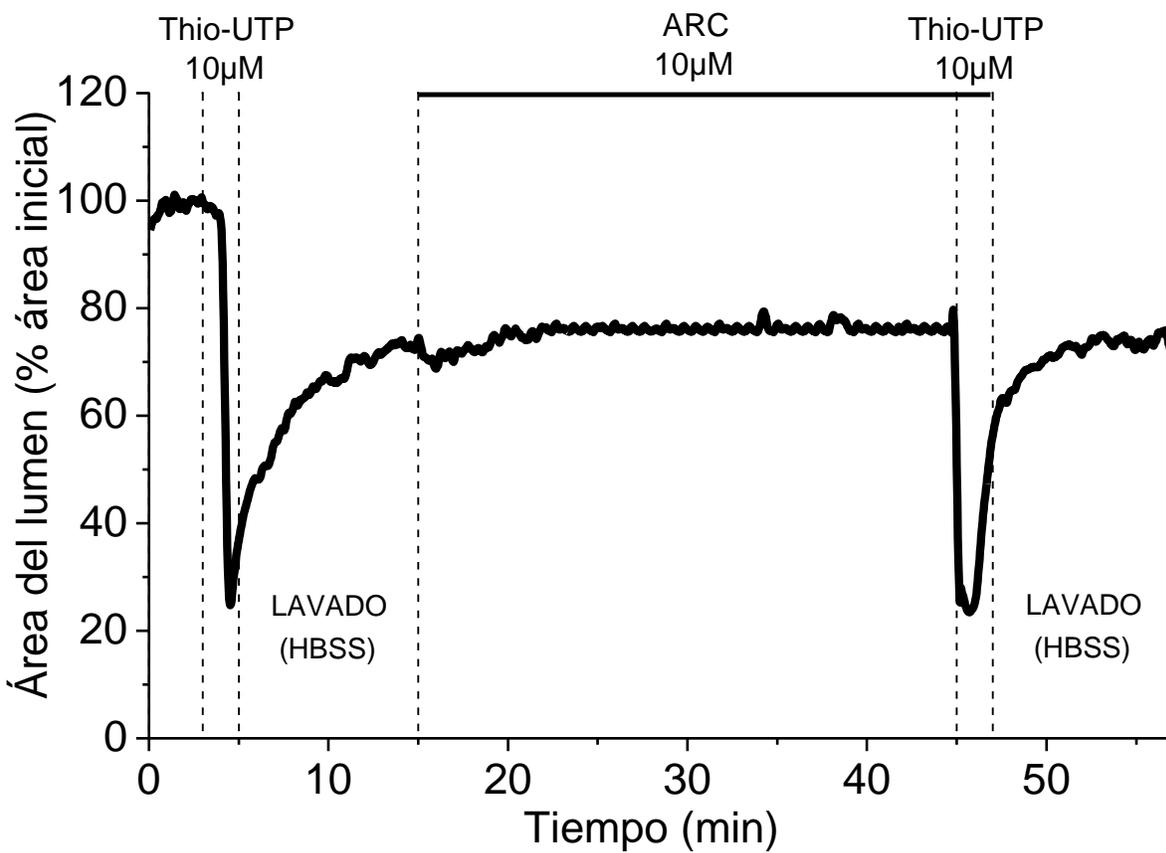


Figura 21. Gráfico de la cinética del efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en una VIP de una rata con HAP-MCT. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial (eje y), en el tiempo durante la perfusión con Thio-UTP 10 µM y AR-C118925XX 10 µM.

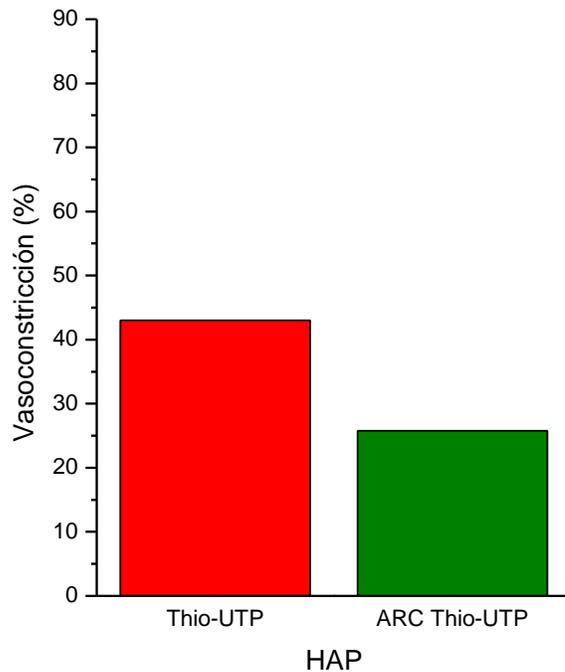


Figura 22. Gráfico de la cuantificación de los experimentos del efecto inhibitorio de AR-C118925XX en la respuesta contráctil inducida por Thio-UTP en VIP del grupo de ratas con HAP-MCT (n=2), expresada como porcentaje de vasoconstricción. El promedio de la actividad contráctil inducida por Thio-UTP (barra roja) es 43,0%, y posteriormente, en presencia del antagonista AR-C118925XX (barra verde) es de 25,7%.

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta contráctil inducida por el nucleótido y en presencia del antagonista para el receptor P2Y₂ en ambos grupos de estudio, en el grupo control se observa una clara tendencia a que la presencia de AR-C118925XX antagoniza parcialmente la respuesta inducida por UTP, ya que esta inhibición es cercana al 50% (57,8±4,3% *versus* 31,7±7,3%) (Figura 16).

En las VIP del grupo de ratas con HAP-MCT, el antagonista inhibe aproximadamente un 21% la respuesta contráctil inducida por UTP (55,7±10,5 43,6±9,1%) (Figura 20), inhibición que no es estadísticamente significativa.

Considerando que para estos experimentos se utilizó un antagonista específico para el receptor P2Y₂ sin evidenciar inhibición importante, ni tampoco estadísticamente significativa en el grupo de ratas con HAP-MCT, esto sugiere en que en este grupo la respuesta inducida por UTP depende principalmente del receptor P2Y₄.

En la actividad contráctil inducida por el agonista de alta afinidad por el receptor P2Y₂ Thio-UTP en el grupo control, no existe diferencia estadísticamente significativa con la respuesta inducida en presencia de AR-C118925XX. A pesar de esto, la respuesta contráctil es inhibida casi cuatro veces (27,0±3,7% *versus* 5,2±2,6%) (Figura 17). No obstante, la respuesta inducida por Thio-UTP en las VIP de las ratas con HAP-MCT es antagonizada parcialmente (Figura 22). En el primer caso, el resultado coincide con la afinidad descrita para ambos, Thio-UTP y AR-

C118925XX, por el receptor P2Y₂. A pesar de esto de la especificidad de cada reactivo, en el caso de las VIP de ratas con HAP-MCT la inhibición es parcial. Se debe considerar que la muestra para esta condición es baja (n=2).

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los experimentos de inhibición, y la muestra en ambos grupos es baja para estudiar la contribución de los receptores P2Y₂ y P2Y₄, estos resultados son clave para continuar el estudio de la respuesta vasoconstrictora de UTP.

La desensibilización de los receptores es la pérdida de respuesta de una célula a la acción de un ligando. Esto determina que la célula quede protegida frente a la estimulación excesiva o prolongada de un agonista. Para descartar que este fenómeno fuese el responsable de la respuesta visualizada como antagonismo en los experimentos con AR-C118925XX, se realizaron dos experimentos como control de este fenómeno (Figura 23 y Figura 24).

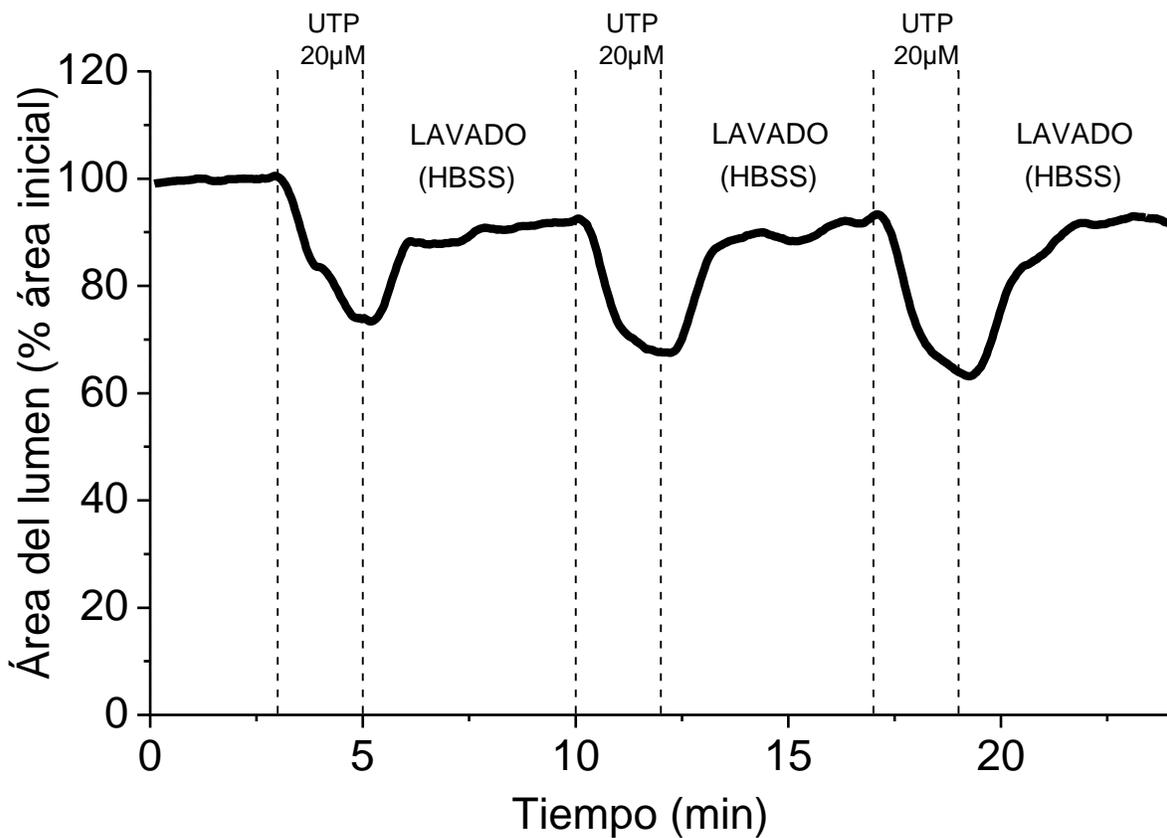


Figura 23. Gráfico de la cinética de experimento control para evaluar el fenómeno de desensibilización de la respuesta contráctil inducida por UTP 20 µM en una VIP de una rata control. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial.

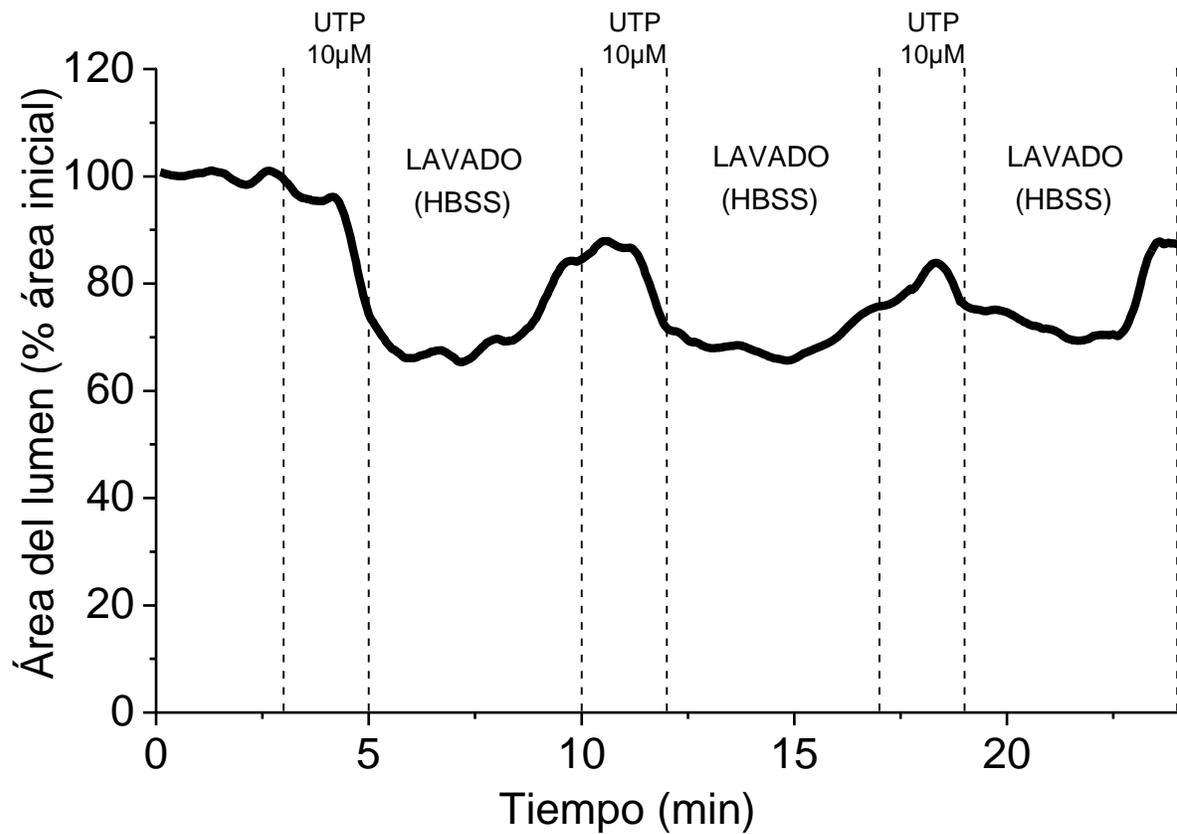


Figura 24. Gráfico de la cinética de experimento control para evaluar el fenómeno de desensibilización de la respuesta contráctil inducida por UTP 10 µM en una VIP de una rata con HAP-MCT. La respuesta contráctil se expresa como porcentaje de la disminución en el área del lumen a partir del calibre inicial.

7.4. Expresión de receptores P2Y₂ y P2Y₄ en células musculares lisas y células endoteliales de VIP

Se realizaron inmunofluorescencias indirectas en VIP de ratas control y con HAP-MCT para demostrar la presencia de receptores purinérgicos P2Y₂ y P2Y₄ en venas intrapulmonares, marcando la α -actina de células musculares lisas y con el marcador específico de Factor de Von Willebrand, que es una glucoproteína producida de forma constitutiva en el endotelio, por lo que permite visualizar la expresión de los receptores en este compartimento. Las imágenes fueron obtenidas en microscopía confocal (Microscopio Confocal C2+ NIKON) a una magnificación de 40X.

En las Figuras 25, 26 y 27 se muestran las imágenes de los controles sin anticuerpo primario.

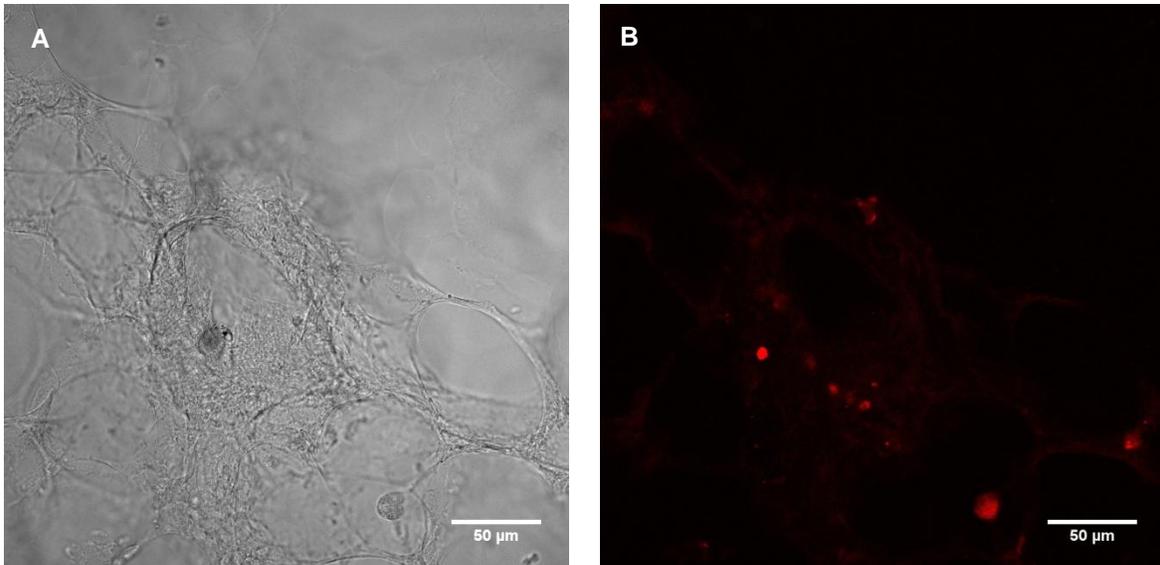


Figura 25. Control Negativo para el anticuerpo secundario Alexa Fluor 633. (A) Contraste de fase, (B) Anticuerpo secundario.

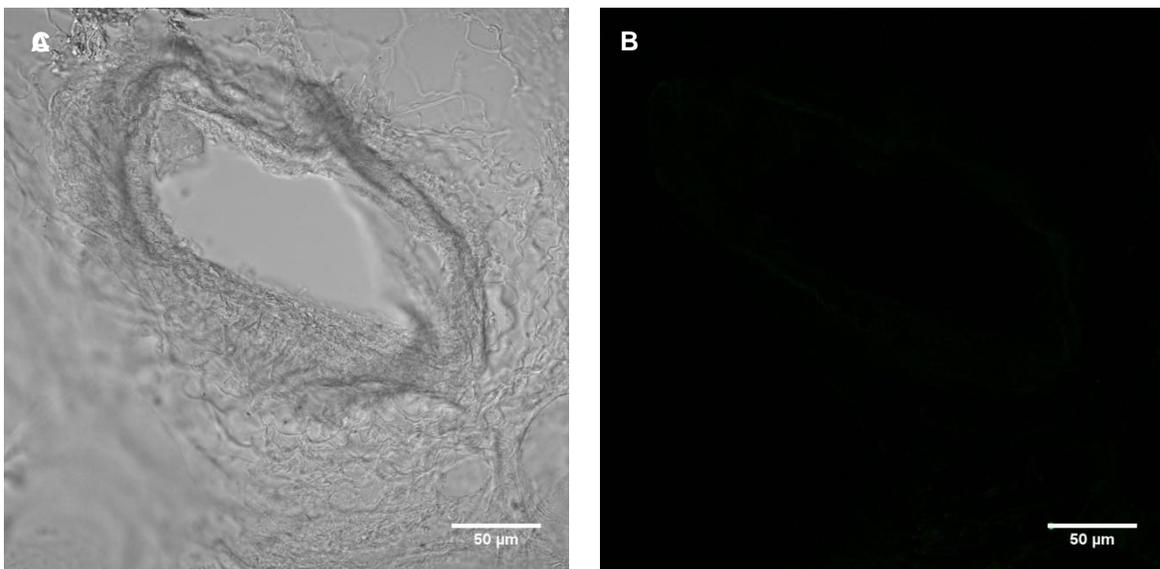


Figura 26. Control Negativo para el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 utilizado contra el receptor P2Y₂. (A) Contraste de fase, (B) Anticuerpo secundario.

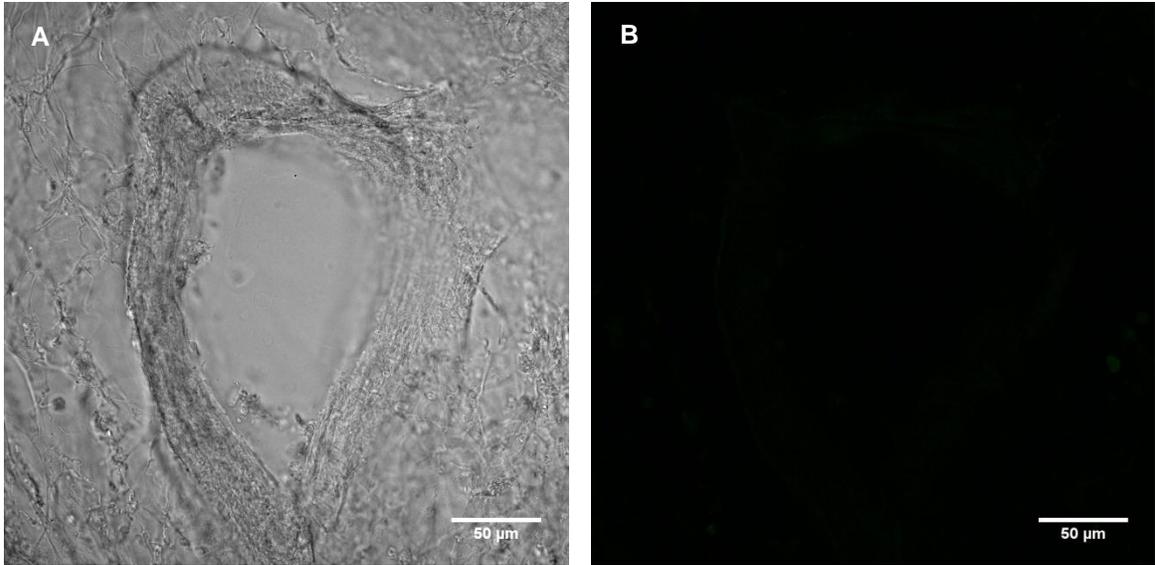


Figura 27. Control Negativo para el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 utilizado contra el receptor P2Y₄. (A) Contraste de fase, (B) Anticuerpo secundario.

En la Figura 28 se observan las imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₂ y de alfa actina del músculo liso. La imagen en contraste de fase (Figura 28-A) muestra la estructura de la VIP de una rata control, visualizando la pared del vaso (flechas rojas), el lumen en el centro (flecha negra) y espacios aéreos del parénquima pulmonar (flecha blanca).

La celularidad observada por medio de la marca DAPI en la Figura 28-B coincide con lo que corresponde al espesor de la pared del vaso, y la falta de celularidad con el lumen y la ausencia de tejido (flechas blancas), lo que además corresponde a espacios aéreos del parénquima pulmonar.

En la Figura 28-C se observa la marca de la alfa actina del músculo liso, que coincide con la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase y la distribución de núcleos marcados con DAPI. La marca de la alfa actina del músculo liso muestra un patrón fibrilar (flecha blanca) que además no se reconoce en la imagen del control sin anticuerpo primario.

La tinción para el receptor P2Y₂ se observa en la Figura 28-D en verde, y que se distribuye en la pared del vaso. La señal para este receptor coincide con la de la alfa actina del músculo liso al realizar el Merge para ambos (Figura 29).

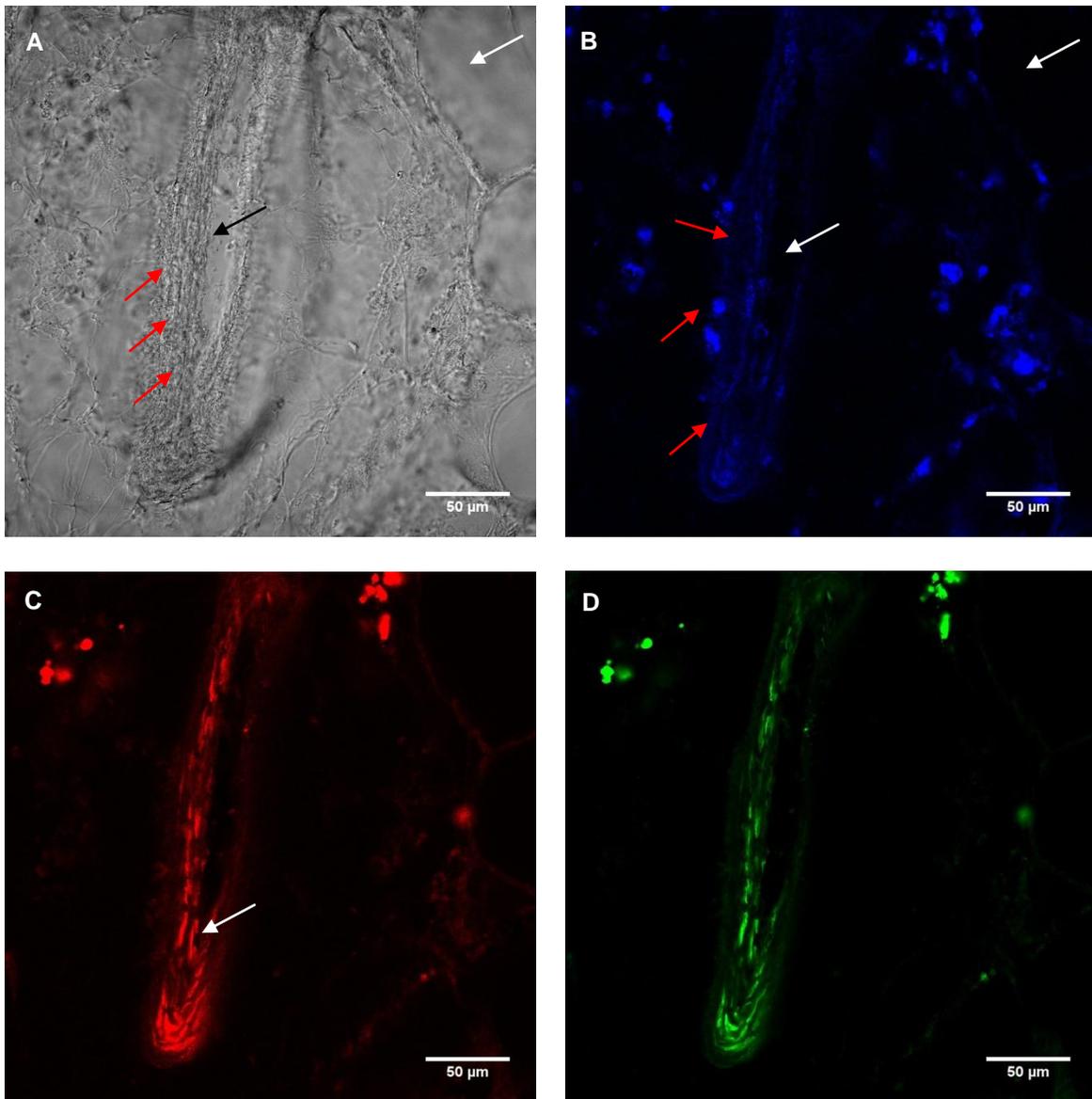


Figura 28. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) alfa actina del músculo liso, (D) receptor P2Y₂

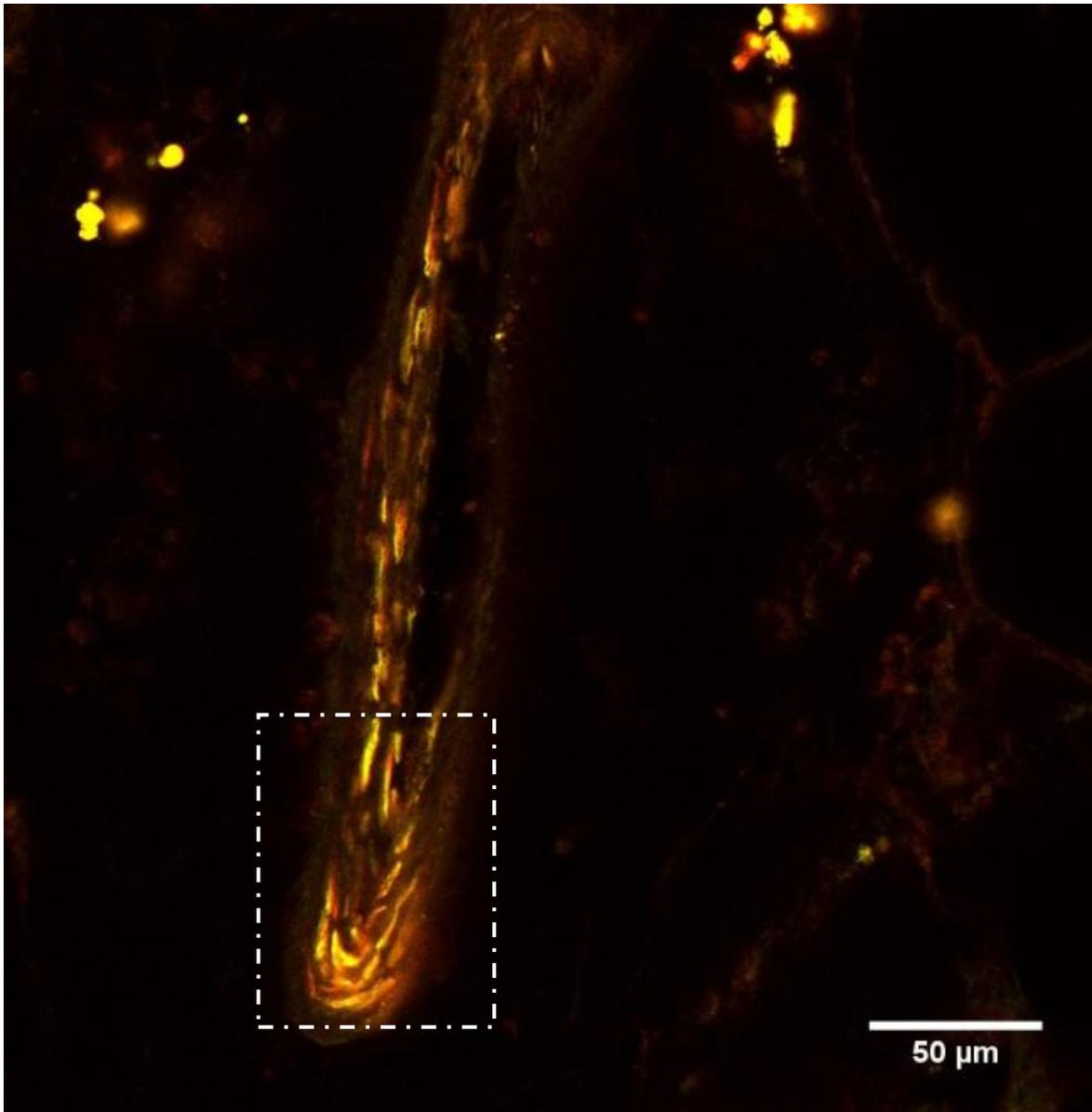


Figura 29. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. Merge de la presencia del receptor $P2Y_2$, (Figura 28-B) y alfa actina del musculo liso (Figura 28-C).

En ls Figuras 29 y 30 se observa la colocalización del receptor $P2Y_2$ con la alfa actina del musculo liso (flechas blancas).

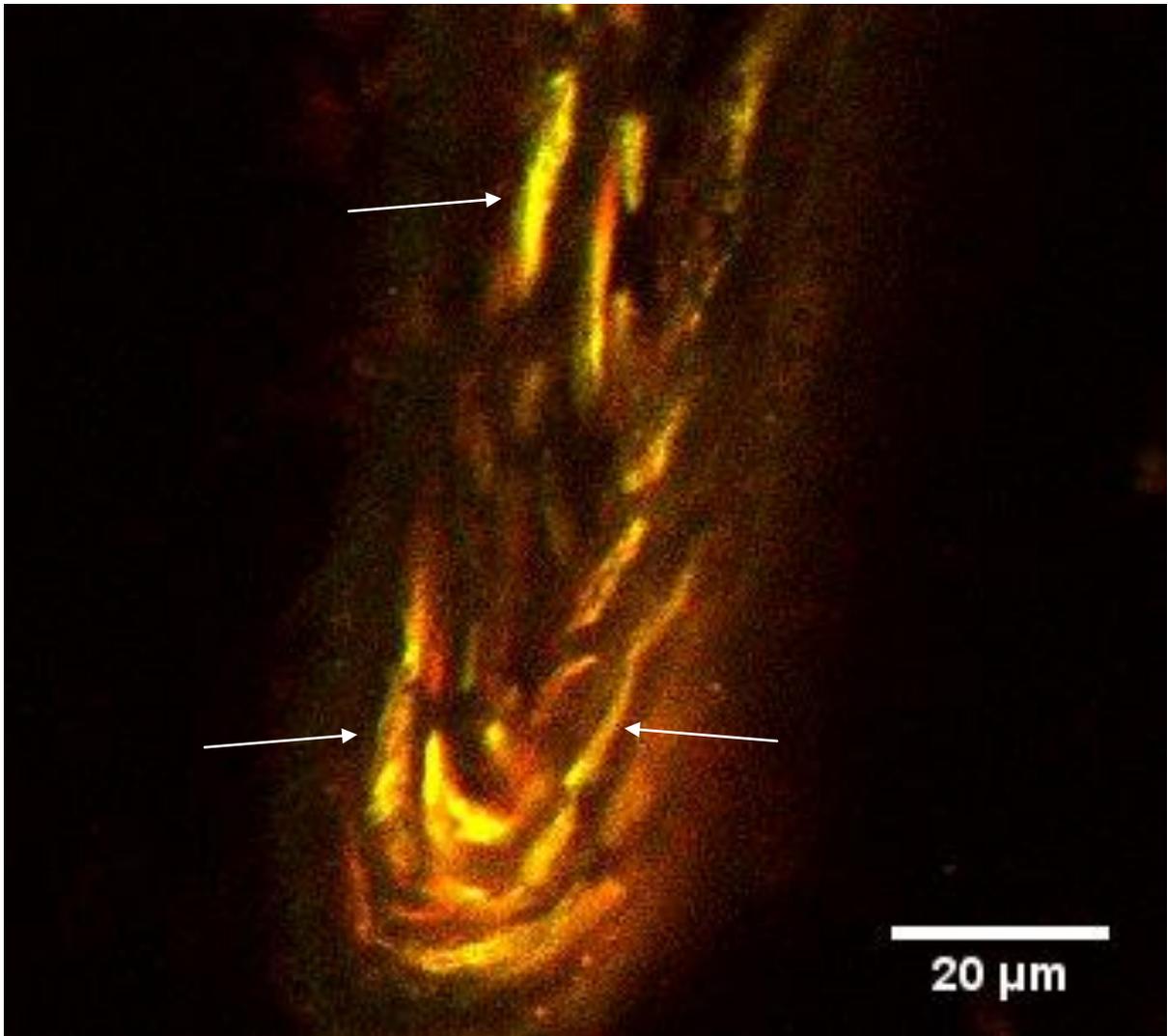


Figura 30. Magnificación del Merge de la presencia del receptor P2Y₂, y alfa actina del musculo liso (Figura 29)

En la Figura 31 se muestra imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₂ y del Factor de Von Willebrand. La imagen en contraste de fase (Figura 31-A) muestra la estructura de la VIP de una rata control, visualizando la pared del vaso (flechas rojas), el lumen en el centro (flecha negra).

La marca de DAPI en la Figura 31-B coincide con lo que corresponde al espesor de la pared del vaso (flechas trojas), y la falta de celularidad con el lumen (flecha blanca) observado en el contraste de fase.

En la Figura 31-C se observa la marca del Factor de Von Willebrand, que coincide con el interior de la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase (Figura 31-A, flecha blanca). Sin embargo la marca no muestra un patrón de una monocapa luminal, en toda la VIP fotografiada, considerando que la ubicación del Factor de Von Willebrand corresponde a la capa íntima y el tejido subendotelial.

La tinción para el receptor P2Y₂ se observa en la Figura 31-D en verde, y que se distribuye con mayor señal en el espesor de la pared del vaso (Flechas blancas). La señal para este receptor coincide con la del Factor de Von Willebrand al realizar el Merge para ambos (Figura 32 y 33).

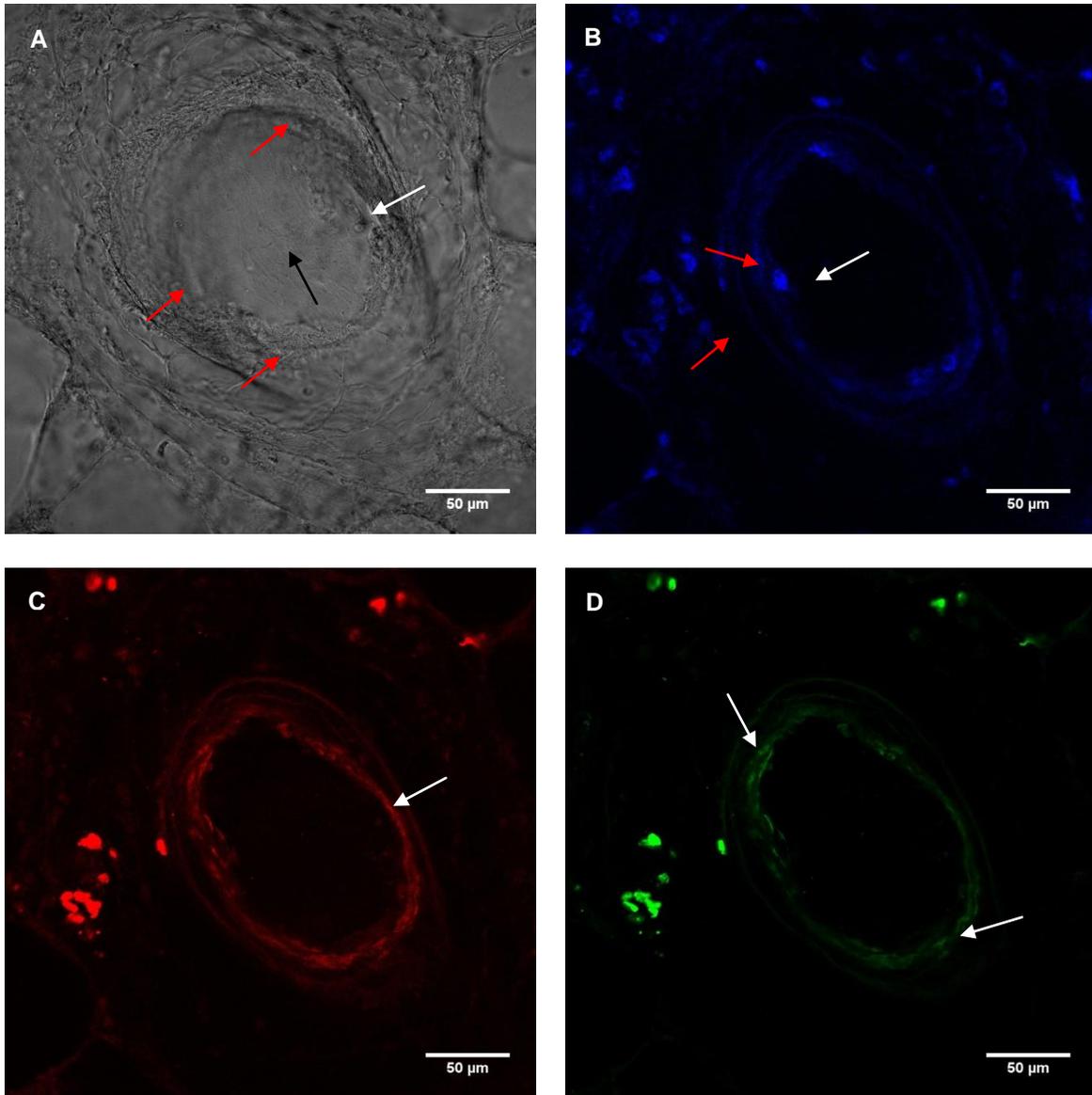


Figura 31. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) Factor de von Willebrand, (D) receptor P2Y₂

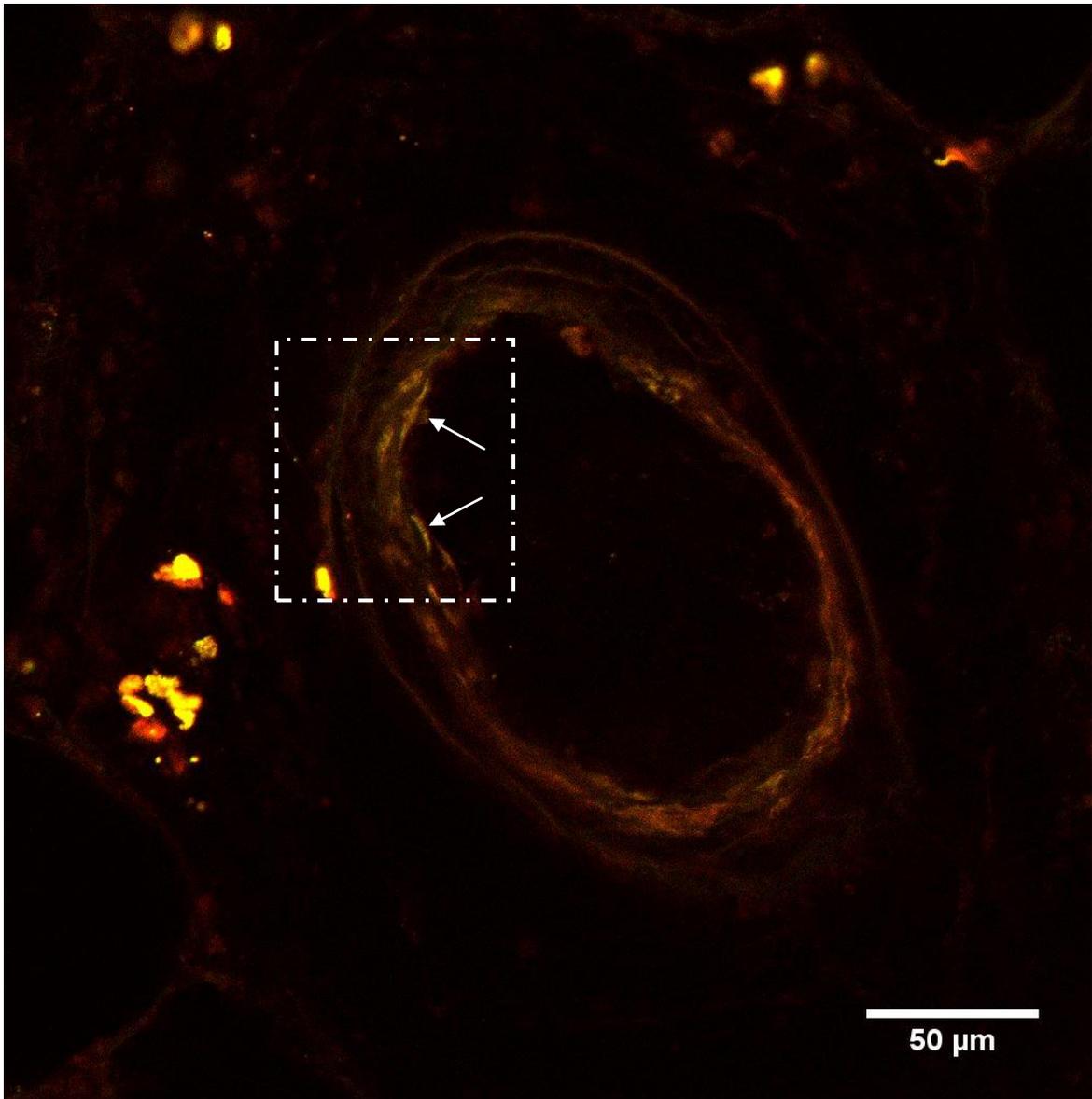


Figura 32. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. Merge de la presencia del receptor $P2Y_2$, (Figura 31-B) Factor de von Willebrand (Figura 31-C).

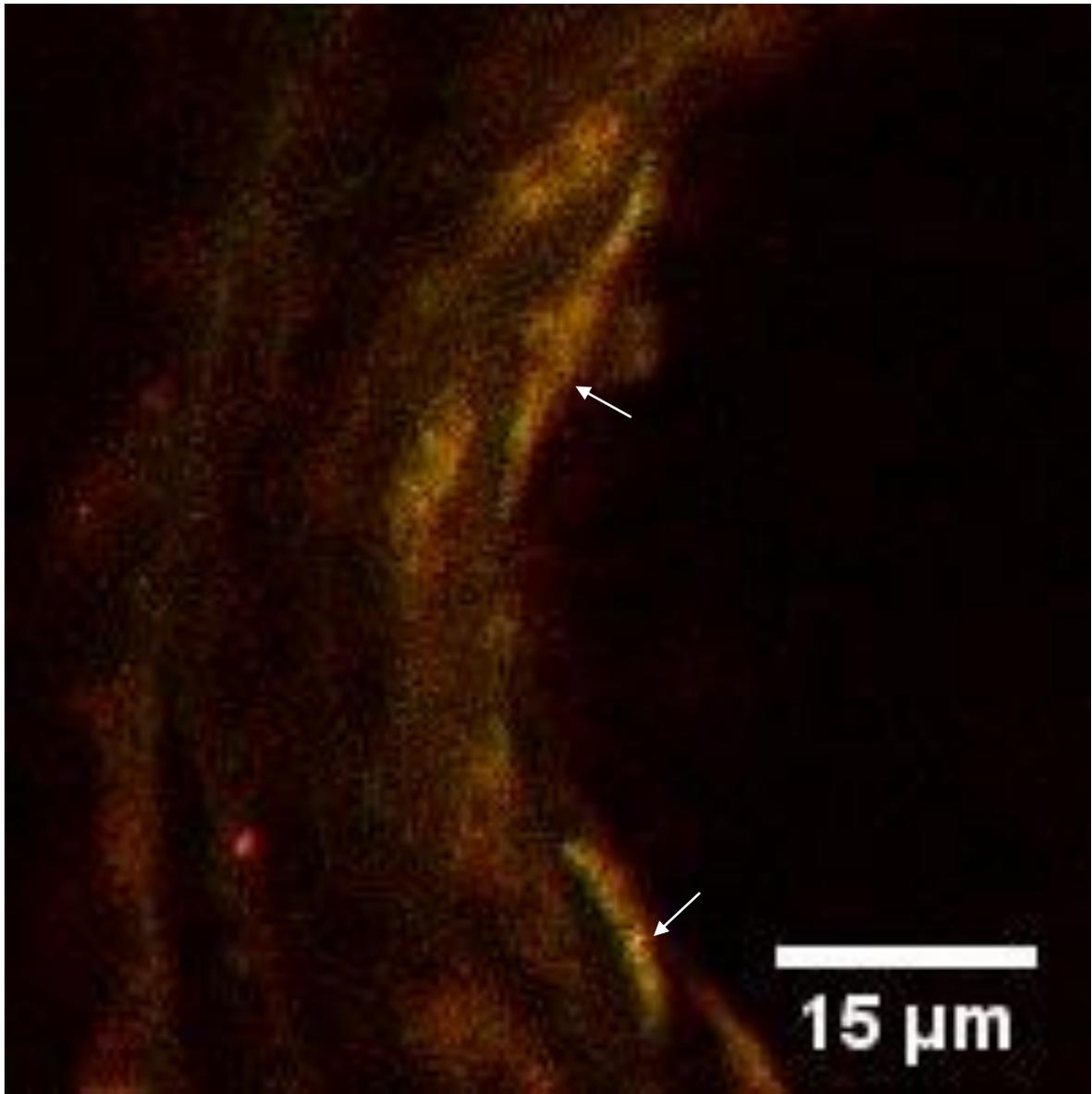


Figura 33. Magnificación del Merge de la presencia del receptor P2Y₂, y Factor de Von Willebrand (Figura 32).

En la Figura 34 se observan las imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₄ y de alfa actina del músculo liso. La imagen en contraste de fase (Figura 34-A) muestra la estructura de la VIP visualizando la pared del vaso (flechas rojas) y el lumen (flecha negra).

La celularidad observada por medio de la marca DAPI en la Figura 34-B coincide con lo que corresponde al espesor de la pared del vaso (flechas rojas), y la falta de celularidad con el lumen y la ausencia de tejido (flecha blanca).

En la Figura 34-C se observa la marca de la alfa actina del músculo liso que coincide con la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase y la distribución de núcleos marcados con DAPI. La marca de la alfa actina del músculo liso muestra un patrón fibrilar circular continuo en el espesor de la capa media (flecha blanca) que además no se reconoce en la imagen del control sin anticuerpo primario.

La marca del receptor P2Y₄ se observa en la Figura 34-D y se distribuye en la pared del vaso. La señal para este receptor coincide con la de la alfa actina del músculo liso al realizar el Merge para ambos (Figura 35 y 36).

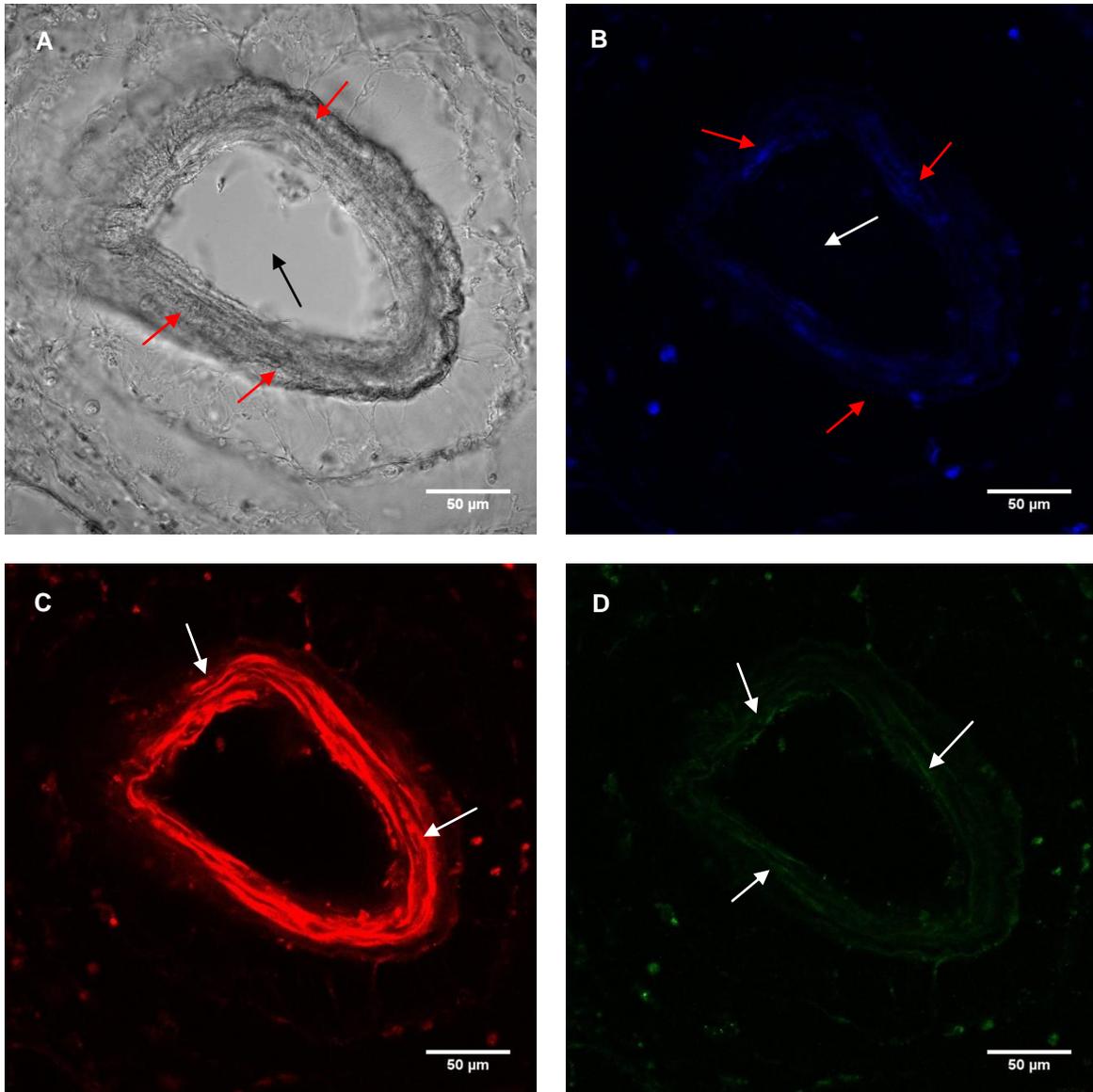


Figura 34. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) alfa actina del músculo liso, (D) receptor P2Y₄

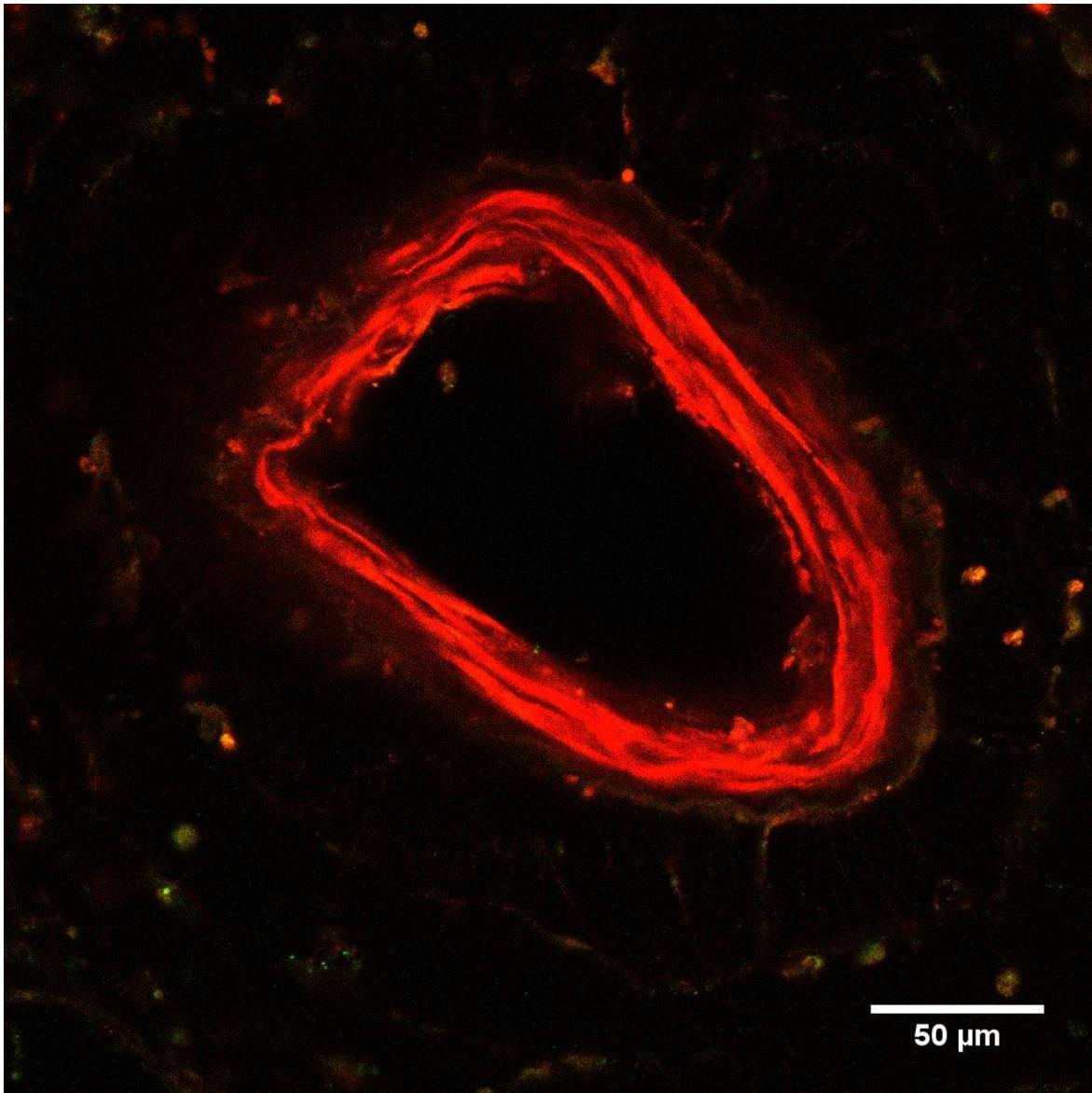


Figura 35. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. Merge de la presencia del receptor P2Y₂, (Figura 34-B) y alfa actina del músculo liso (Figura 34-C).

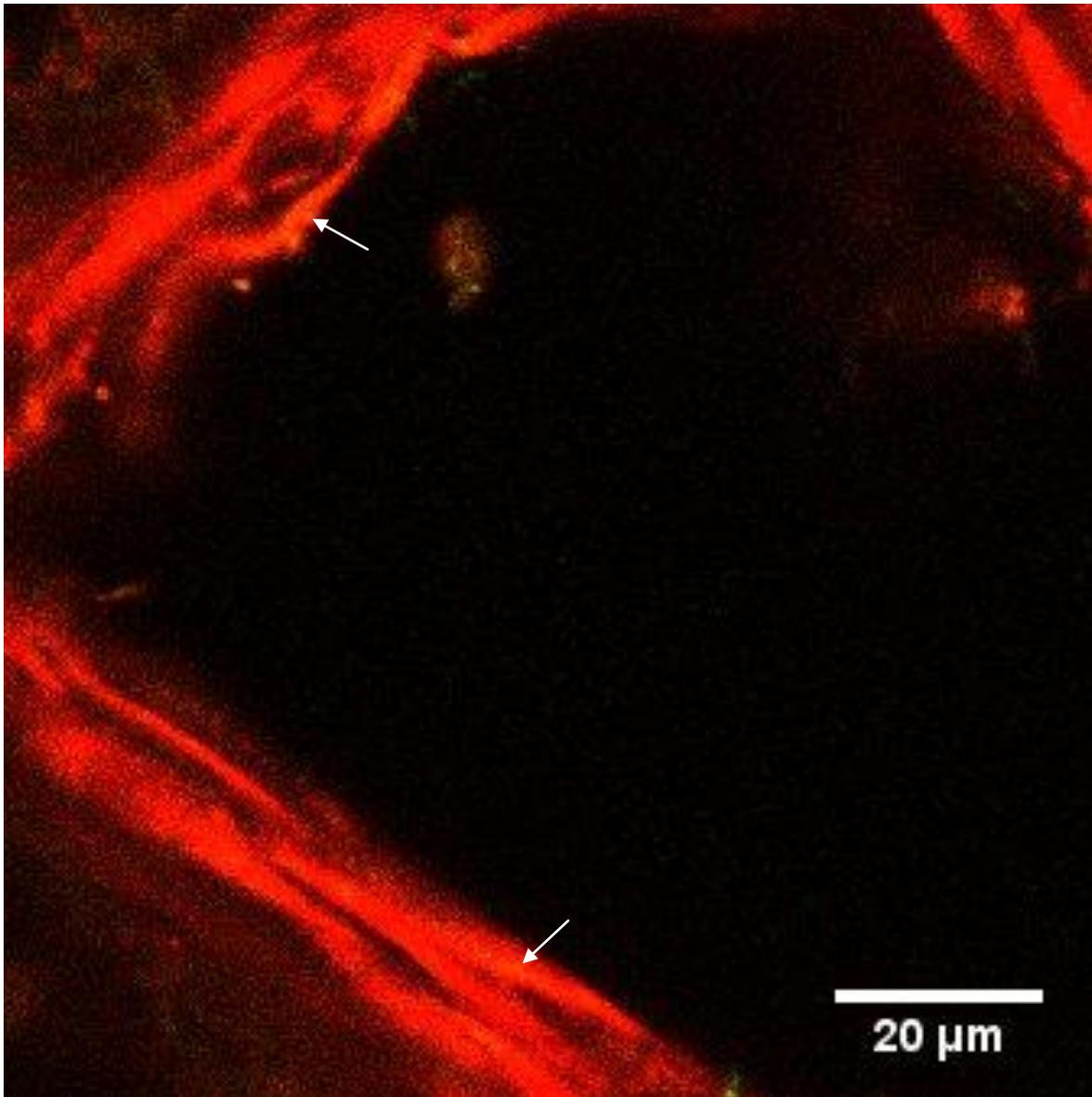


Figura 36. Magnificación del Merge de la presencia del receptor P2Y₂, y alfa actina del músculo liso (Figura 35).

En la Figura 37 se muestra imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₄ y del Factor de Von Willebrand. La imagen en contraste de fase (Figura 37-A) muestra la estructura de la VIP de una rata control, visualizando la pared del vaso (flechas rojas), el lumen en el centro (flecha negra).

La marca de DAPI en la Figura 37-B coincide con el espesor de la pared del vaso (flechas trojas), y la falta de celularidad con el lumen (flecha blanca) observado en el contraste de fase.

En la Figura 37-C se observa la marca del Factor de Von Willebrand, que coincide con el interior de la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase (Figura 37-A). Nuevamente la marca no muestra un patrón de una monocapa luminal, en toda la VIP fotografiada, considerando que la ubicación del Factor de Von Willebrand corresponde a la capa íntima y el tejido subendotelial.

La tinción para el receptor P2Y₂ se observa en la Figura 37-D y se observa señal en zonas específicas en toda la pared de la VIP (flechas blancas). En la Figura 38 y 39 se muestra el Merge de la señal del Factor de Von Willebrand y el receptor P2Y₄, se observa señal independiente del receptor P2Y₄ de la del Factor de Von Willebrand (flechas rojas), como también pequeñas zonas que podrían corresponder a colocalización (flechas blancas).

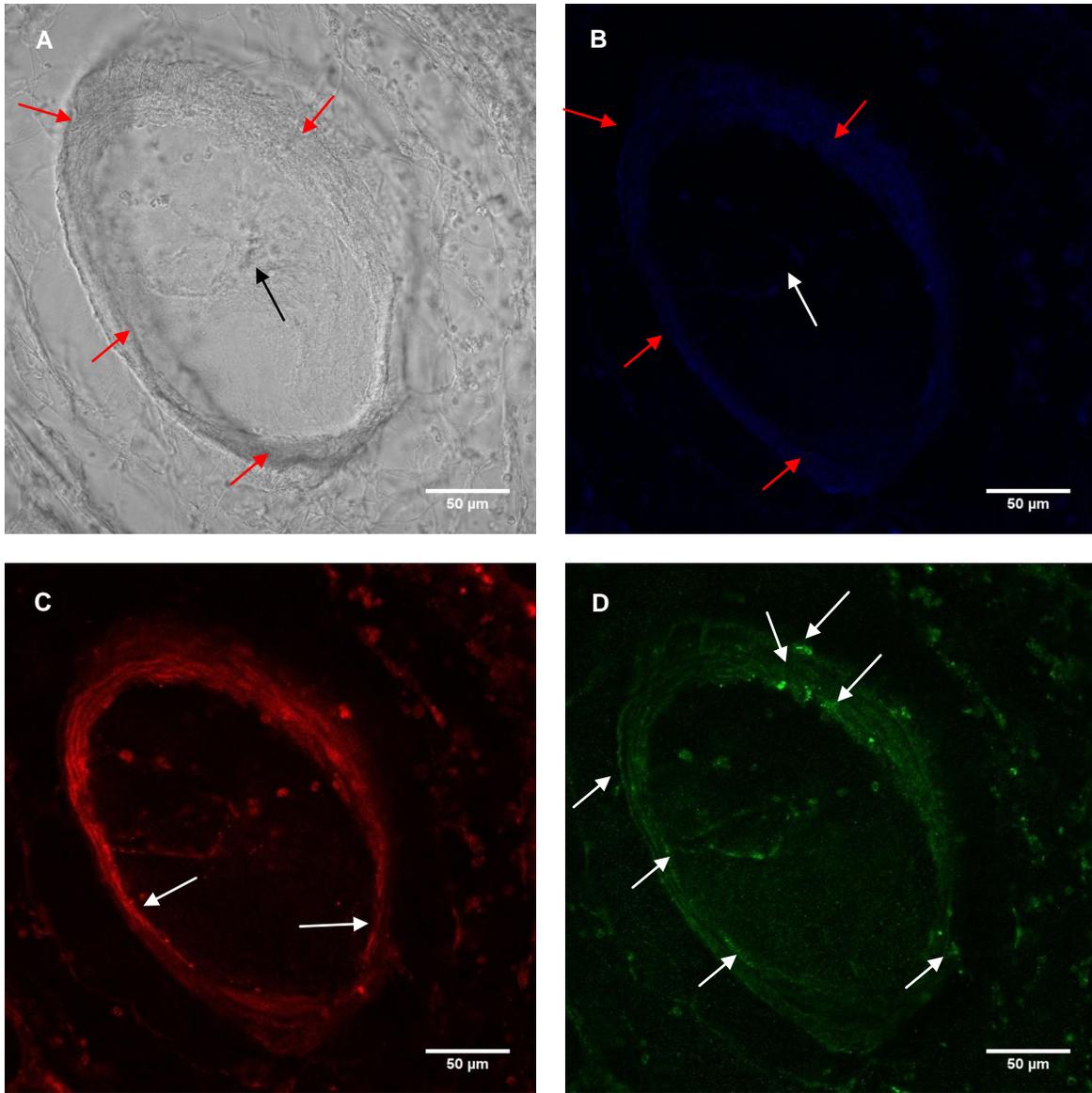


Figura 37. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) Factor de von Willebrand, (D) receptor P2Y₄

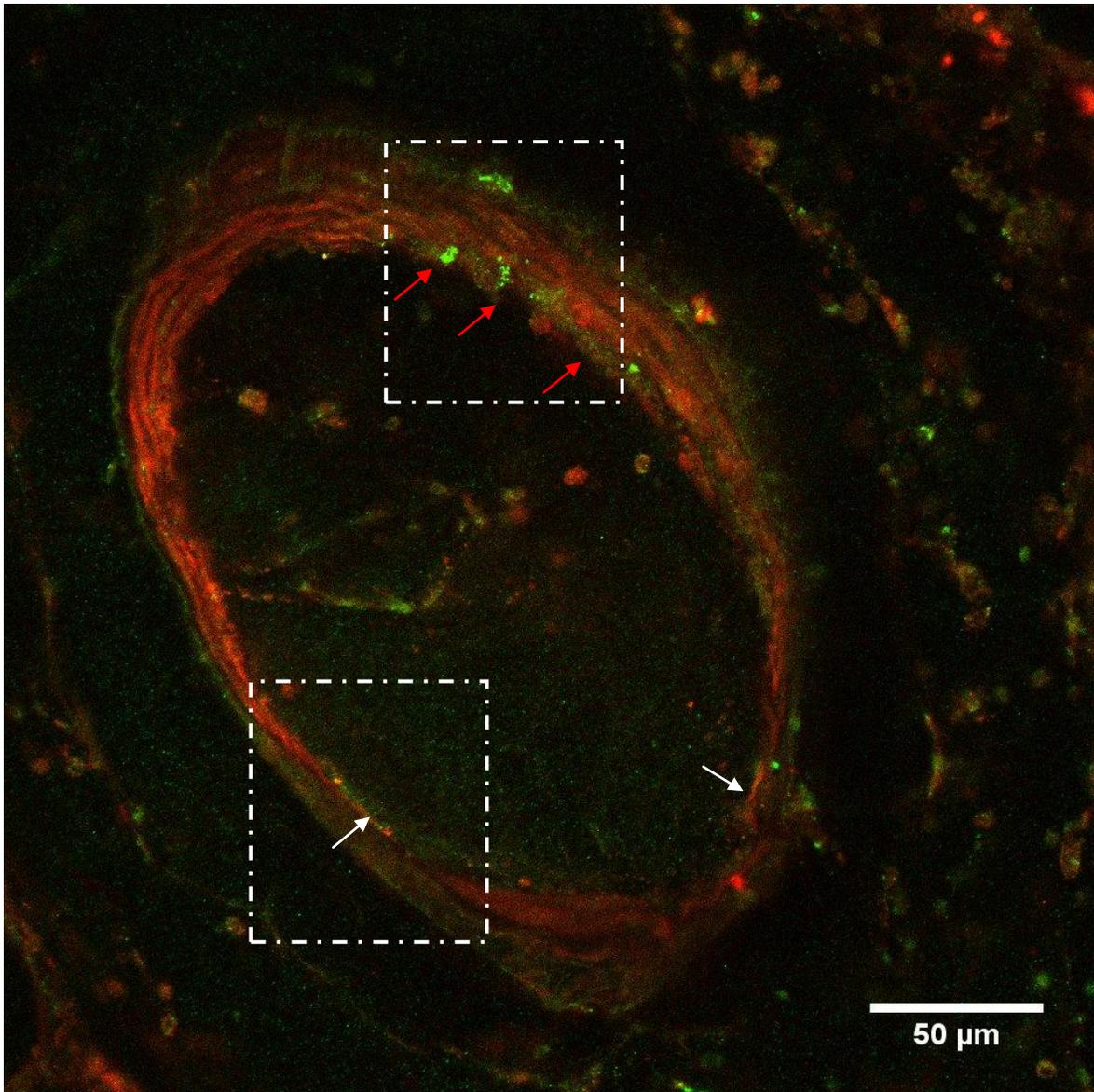


Figura 38. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata Control. Merge de la presencia del receptor $P2Y_4$, (Figura 37-B) Factor de von Willebrand (Figura 37-C).

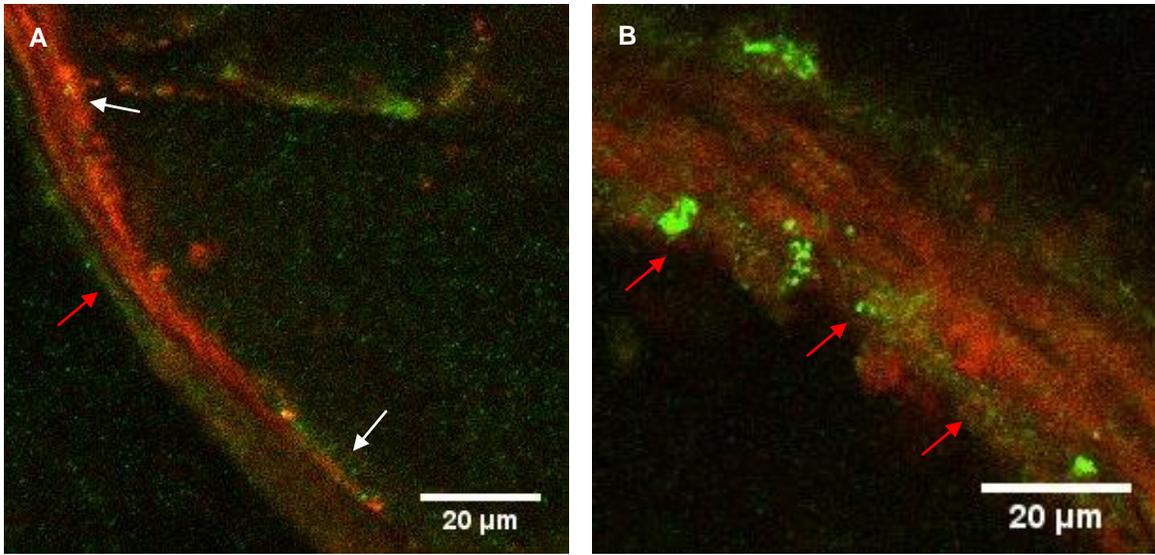


Figura 39. Magnificación del Merge de la presencia del receptor $P2Y_4$, y el Factor de von Willebrand (Figura 38).

En la Figura 40 se observan las imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₂ y de alfa actina del músculo liso en una VIP de una rata con HAP-MCT. La imagen en contraste de fase (Figura 40-A) muestra la estructura de la VIP visualizando la pared del vaso (flechas rojas) y el lumen (flecha negra). Además por la orientación de esta VIP, el lumen no es perpendicular al plano de la rebanada de pulmón, por lo que se puede observar la pared de la VIP por el interior (arcos negros). En las VIP de ratas con HAP se observa infiltrado celular en la capa adventicia (flechas azules), que podría corresponder a infiltrado inflamatorio, ya descrito en la histología de la HAP (Sutendra G 2013).

La celularidad observada por medio de la marca DAPI en la Figura 40-B coincide con la pared del vaso (flechas rojas), la falta de celularidad con el lumen (flecha blanca) visto en el contraste de fase y confirma el infiltrado celular en la adventicia (flechas amarillas).

En la Figura 40-C se observa la marca de la alfa actina del músculo liso que coincide con la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase. La marca de la alfa actina del músculo liso muestra un patrón fibrilar circular continuo en la pared del vaso (flecha blanca).

La marca del receptor P2Y₂ se observa en la Figura 40-D y se distribuye en la pared del vaso. La señal para este receptor coincide con la de la alfa actina del músculo liso al realizar el Merge para ambos (Figura 41 y 42).

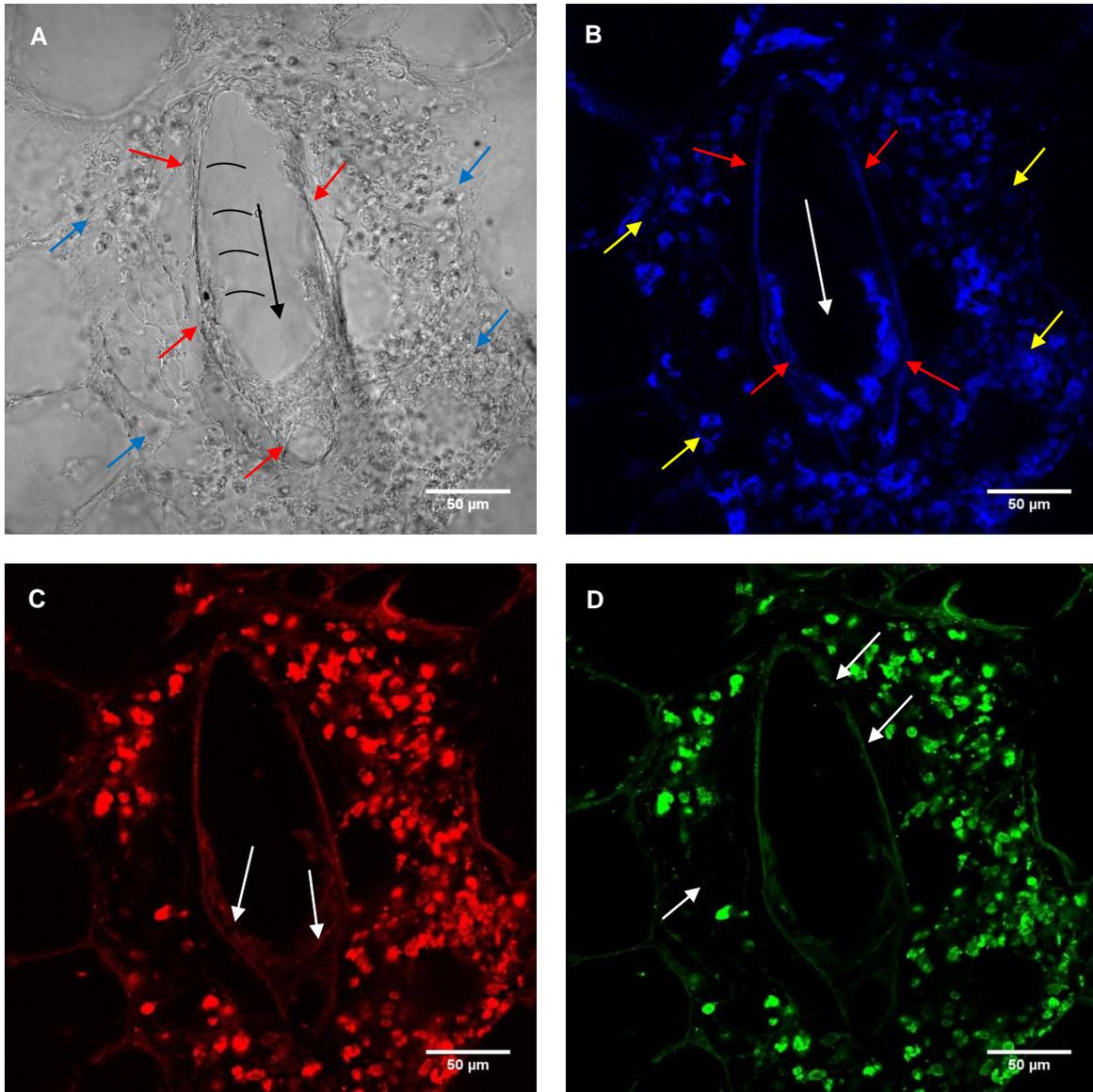


Figura 40. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) alfa actina del músculo liso, (D) receptor P2Y₂.

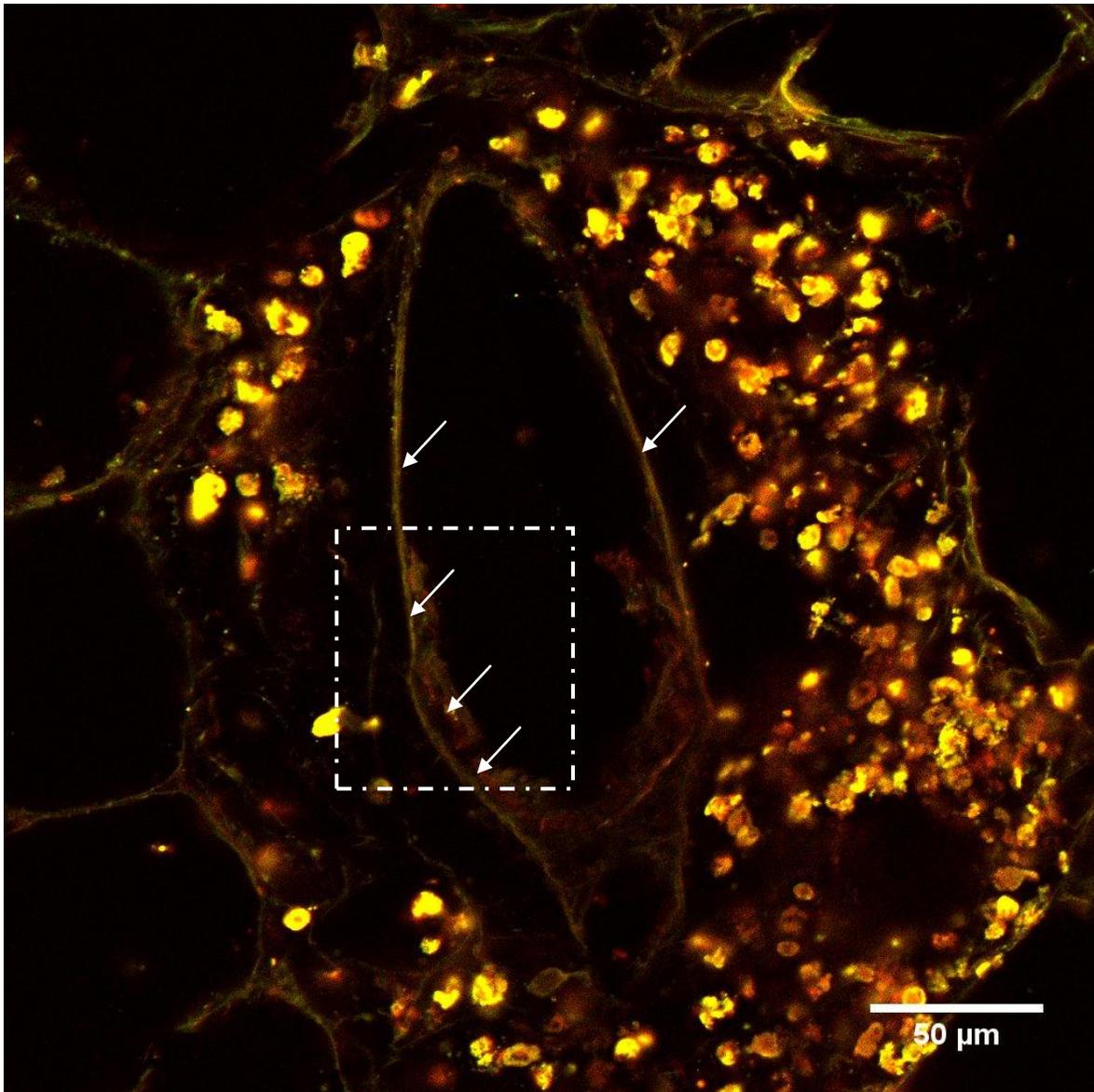


Figura 41. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. Merge de la presencia del receptor $P2Y_2$, (Figura 40-B) y alfa actina del musculo liso (Figura 40-C).

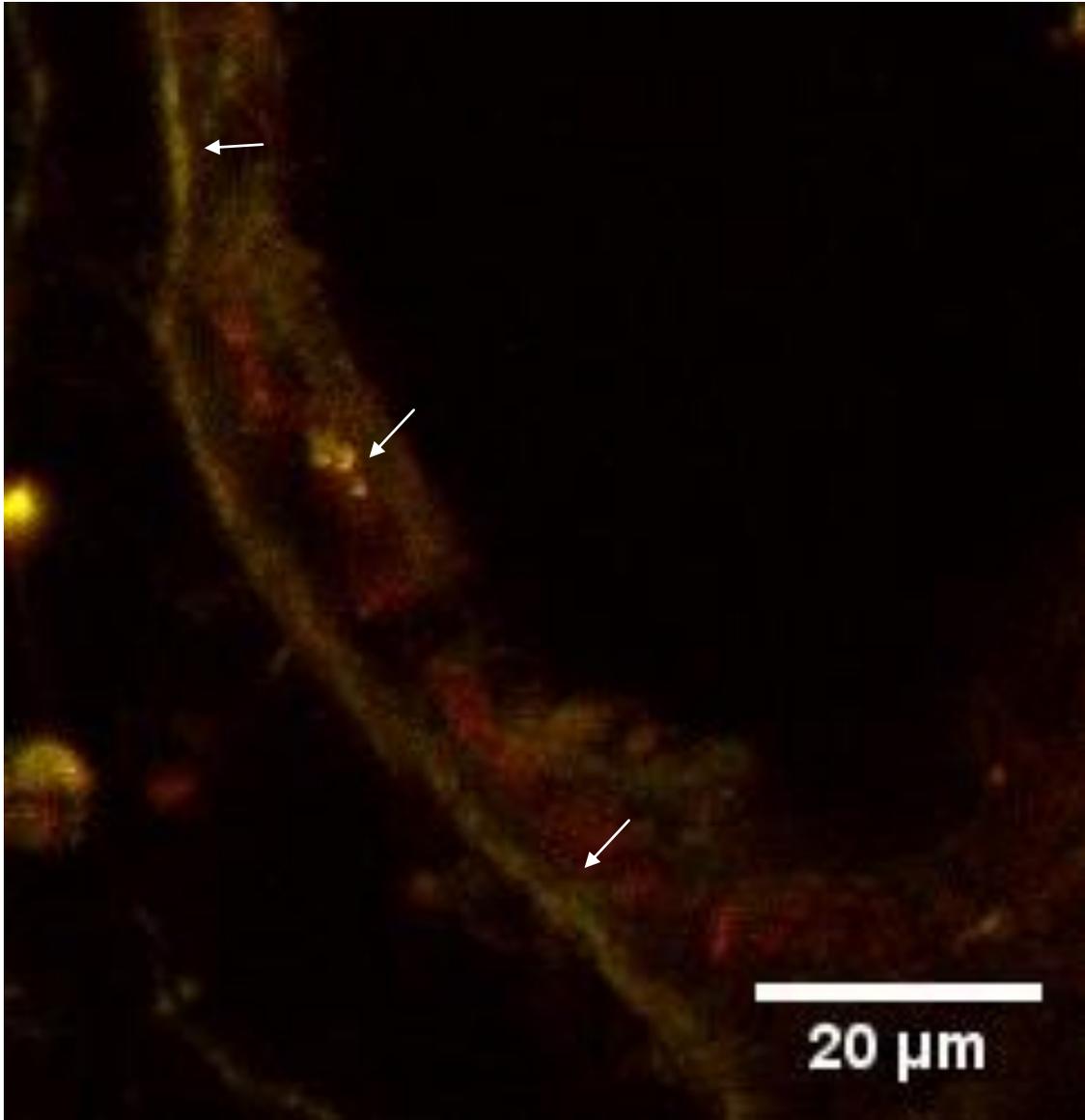


Figura 42. Magnificación del Merge del receptor P2Y₂ y alfa actina del musculo liso (Figura 41).

En la Figura 43 se muestra imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₂ y del Factor de Von Willebrand en una VIP de una rata con HAP-MCT. La imagen en contraste de fase (Figura 43-A) muestra la estructura del vaso, visualizando la pared del vaso (flechas rojas) y el lumen en el centro (flecha negra).

La marca de DAPI en la Figura 43-B coincide con el espesor de la pared del vaso (flechas trojas) observado en el contraste de fase.

En la Figura 43-C se observa la marca del Factor de Von Willebrand, que coincide con el interior de la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase (Figura 43-A).

En la Figura 43-D se observa la marca del receptor P2Y₂ en toda la pared de la VIP (flechas blancas). En la Figura 44 y 45 se muestra el Merge de la señal del Factor de Von Willebrand y el receptor P2Y₂ (flechas blancas) y la marca del receptor de manera independiente (flechas amarillas).

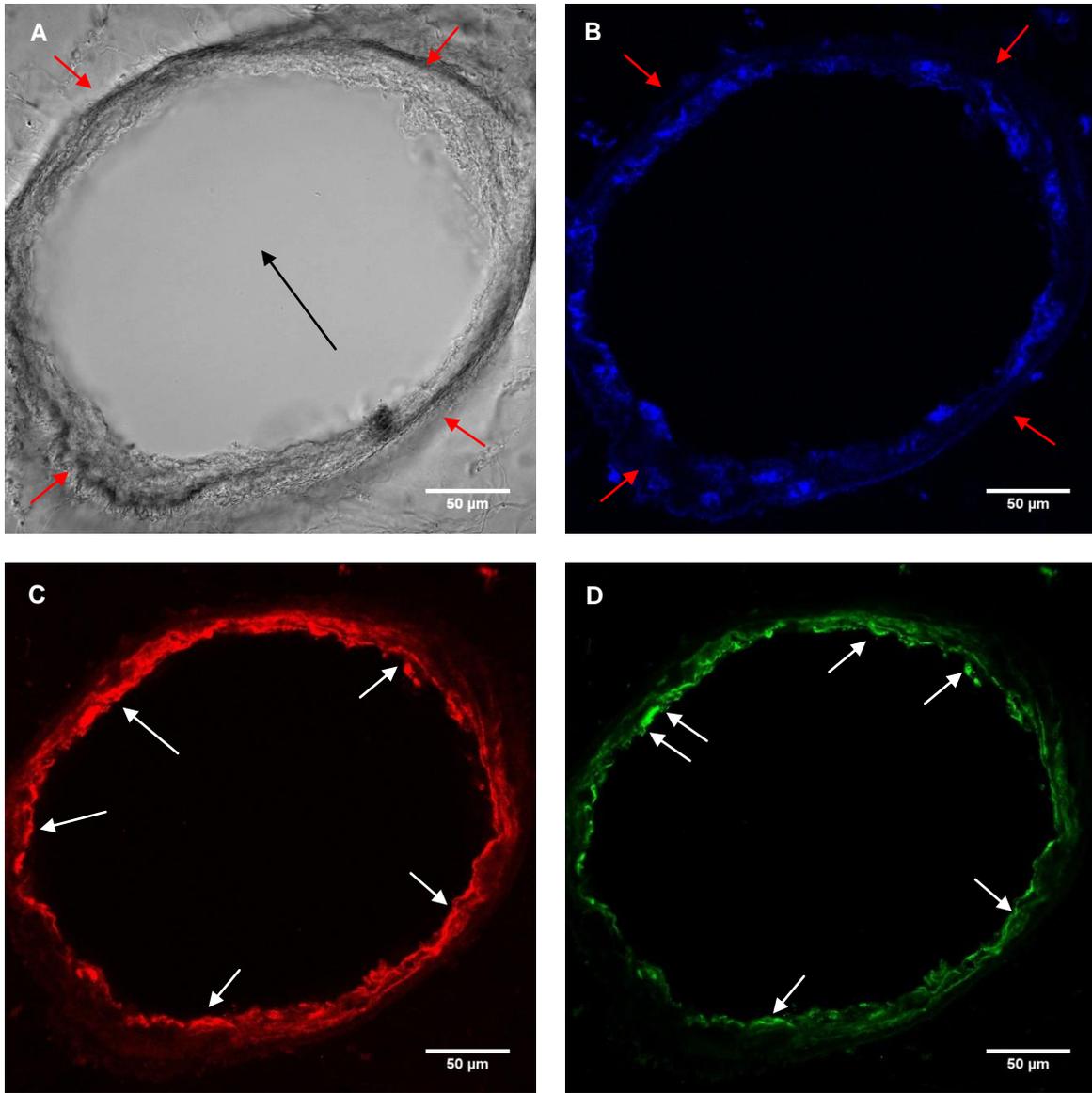


Figura 43. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) Factor de von Willebrand, (D) receptor P2Y₂.

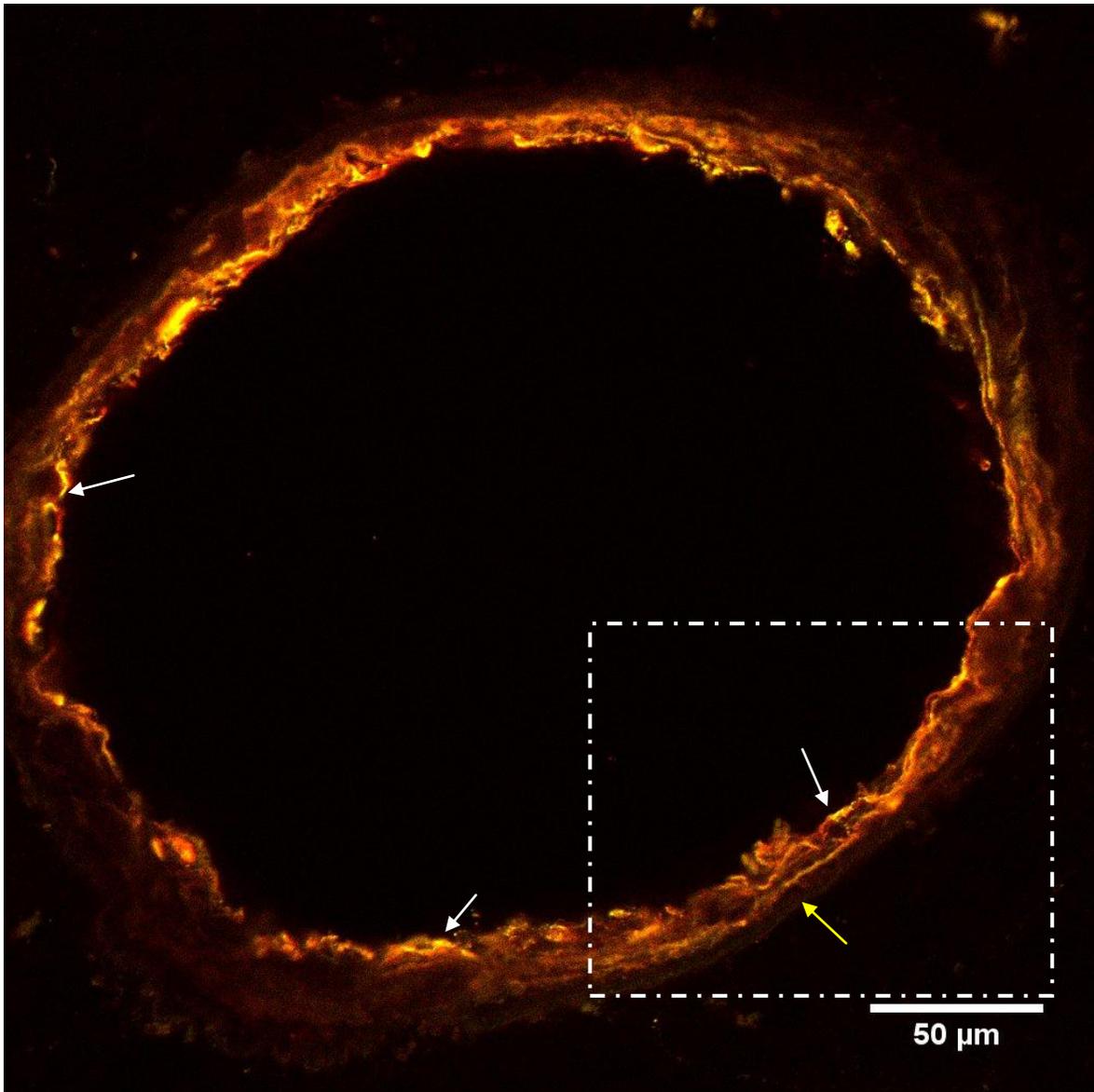


Figura 44. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. Merge de la presencia del receptor $P2Y_2$ (Figura 43-B) y el Factor de von Willebrand (Figura 43-C).

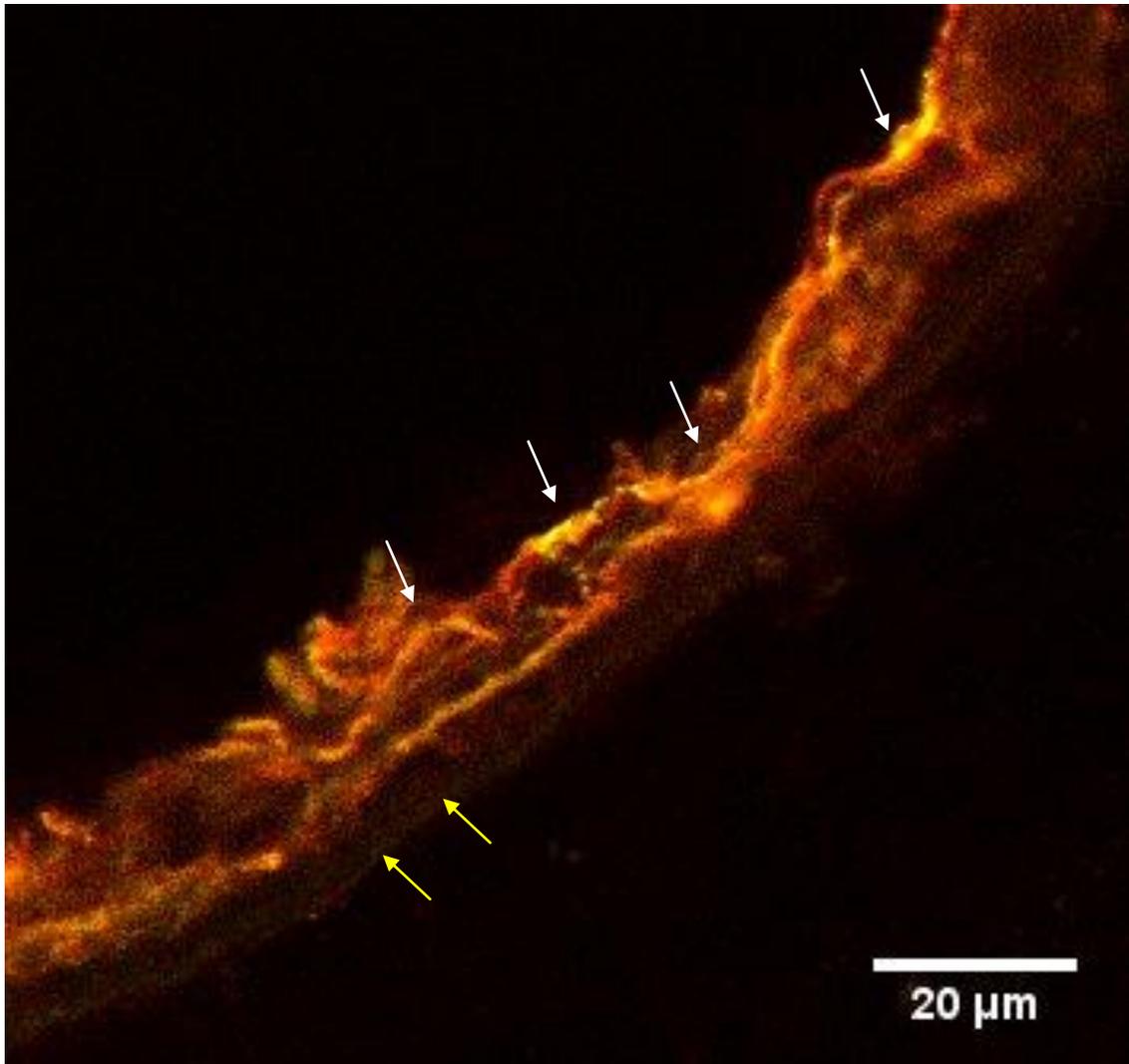


Figura 45. Magnificación del Merge del receptor P2Y₂ y el Factor de von Willebrand (Figura 44).

En la Figura 46 se observan las imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₄ y de alfa actina del músculo liso en una VIP de una rata con HAP-MCT.

La imagen en contraste de fase (Figura 46-A) muestra la estructura de la VIP visualizando la pared del vaso (flechas rojas) y el lumen (flecha negra).

La celularidad observada por medio de la marca DAPI en la Figura 46-B coincide con la pared del vaso (flechas rojas) y la falta de celularidad con el lumen (flecha blanca) visto en el contraste de fase.

En la Figura 46-C se observa la marca de la alfa actina del músculo liso que coincide con la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase. La marca de la alfa actina del músculo liso muestra un patrón fibrilar circular en la pared del vaso (flecha blanca).

La marca del receptor P2Y₂ se observa en la Figura 46-D y se distribuye en el espesor la pared del vaso (flechas blancas). La señal para este receptor coincide con la de la alfa actina del músculo liso al realizar el Merge para ambos (flechas blancas), sin embargo conserva marca independiente del receptor (Figura 47 y 48).

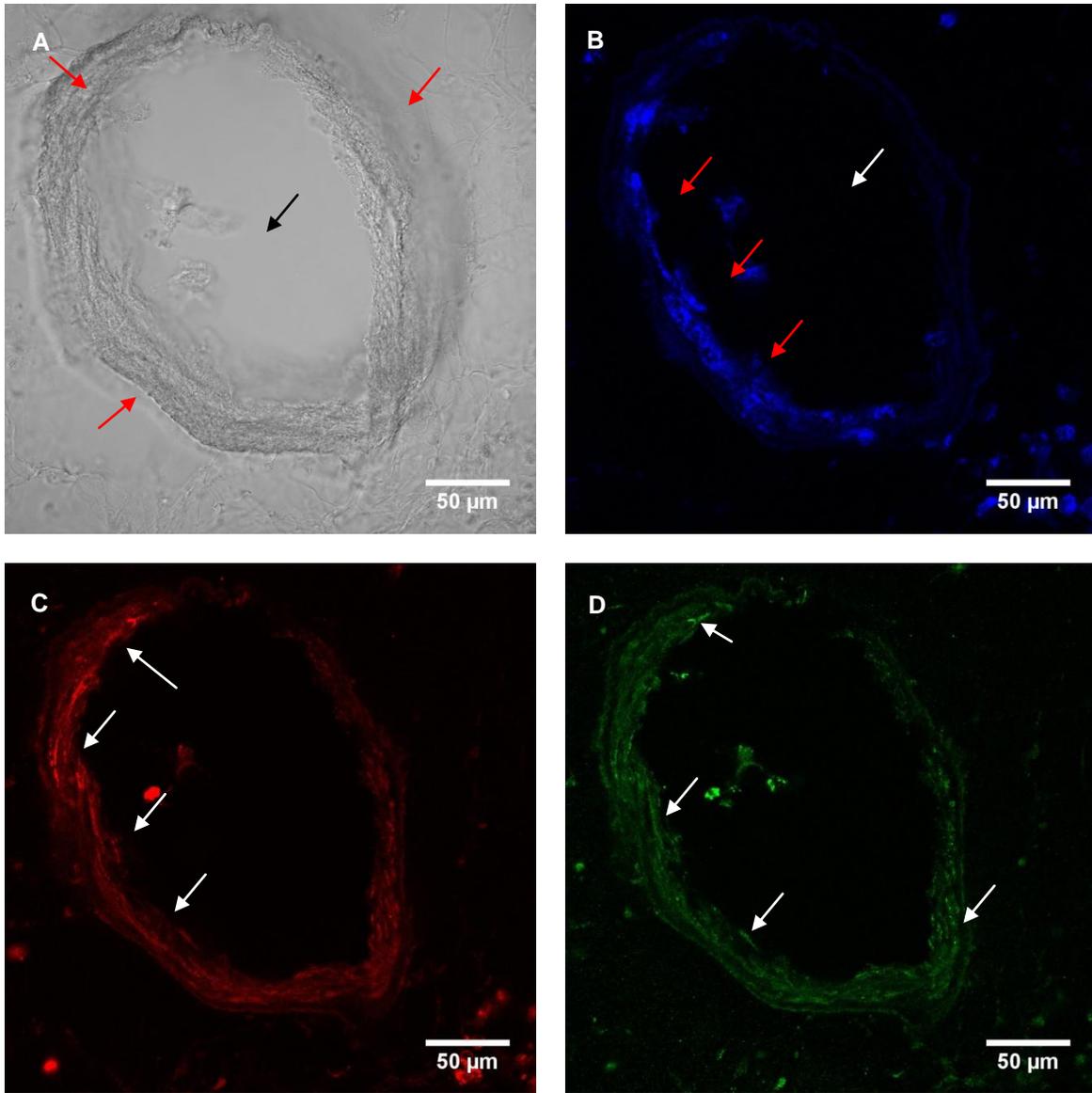


Figura 46. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) alfa actina del músculo liso, (D) receptor P2Y₄.

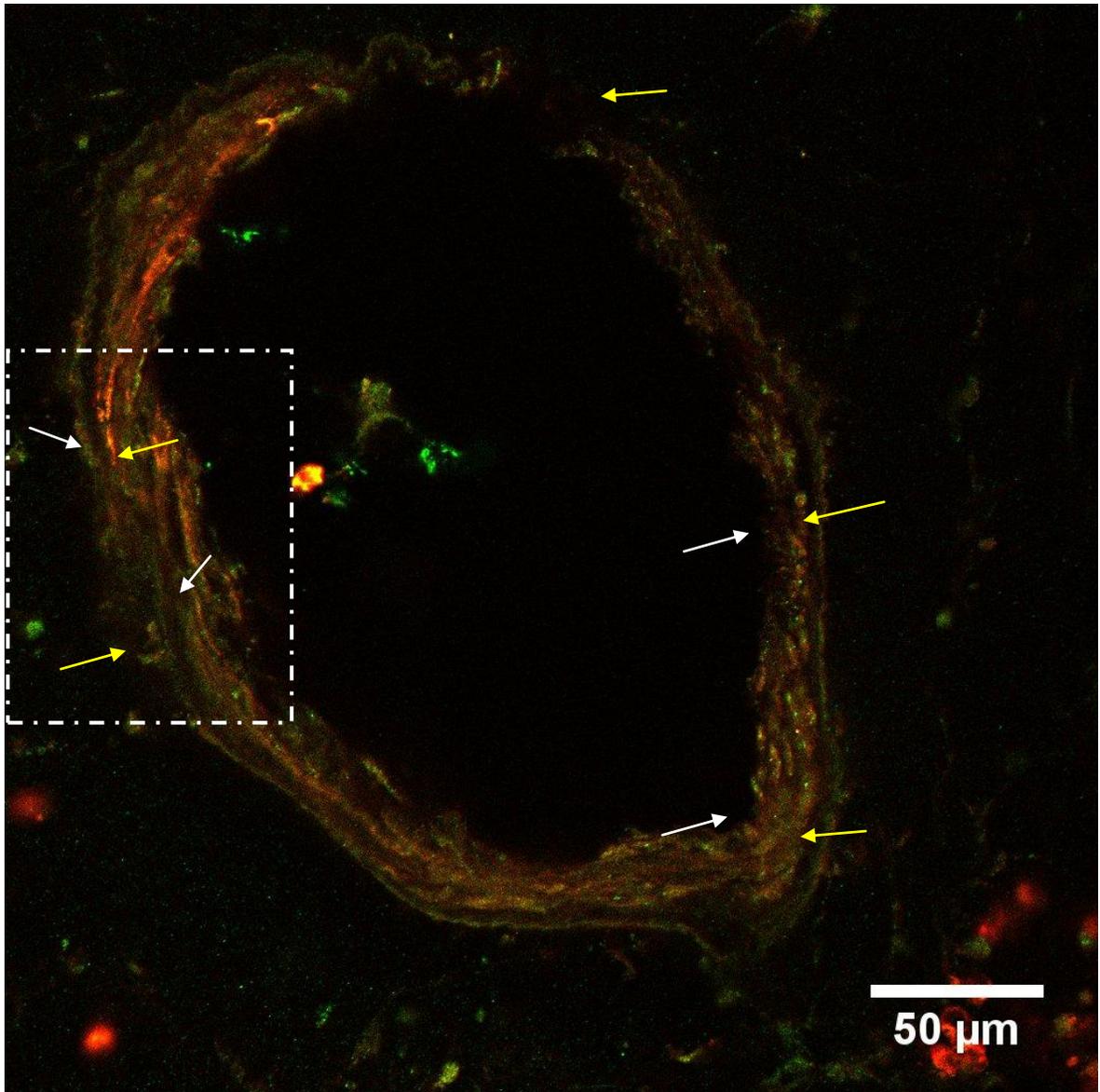


Figura 47. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. Merge de la presencia del receptor $P2Y_4$ (Figura 46-B) y alfa actina del musculo liso (Figura 46-C).

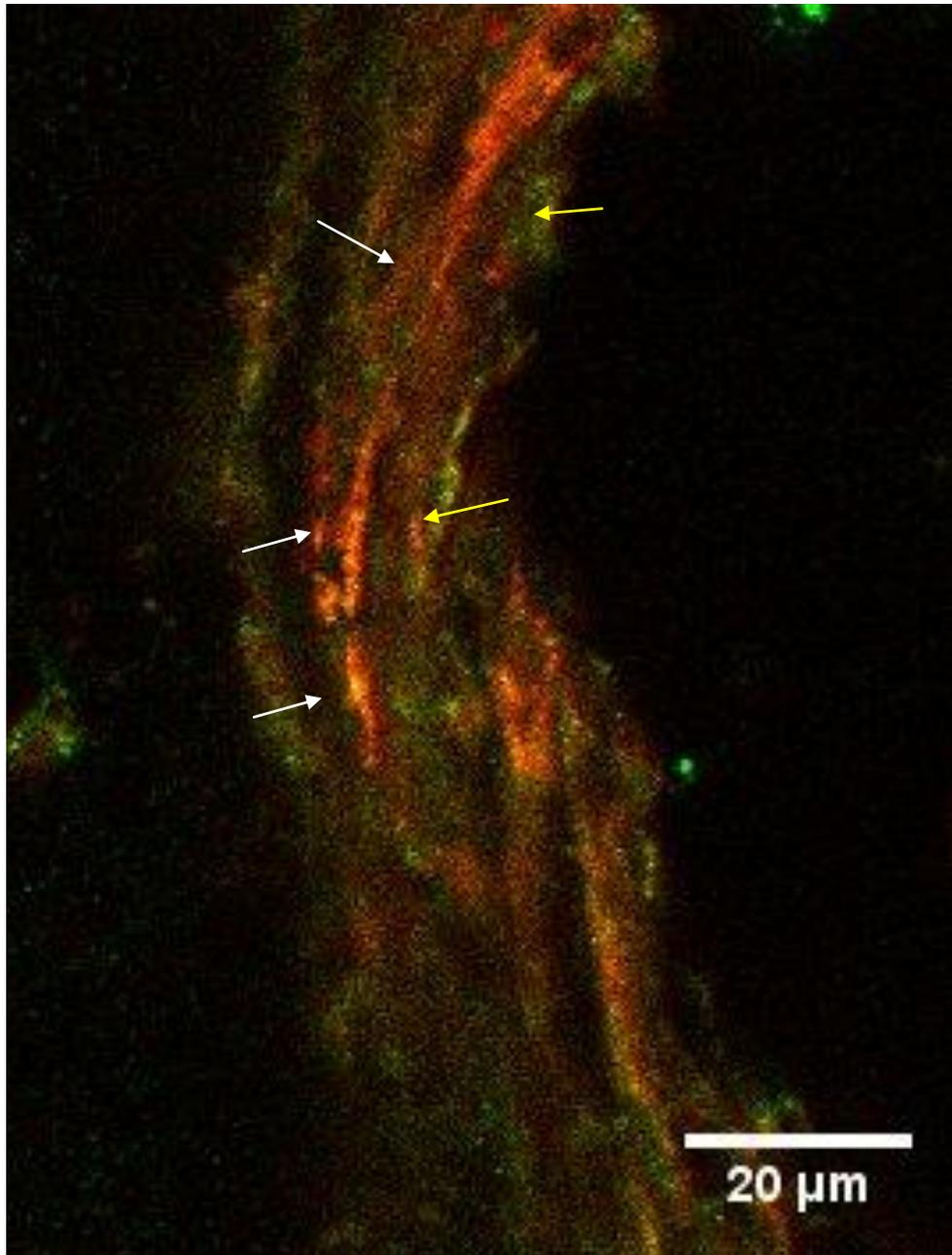


Figura 48. Magnificación del Merge de la presencia del receptor P2Y₄ y alfa actina del musculo liso (Figura 47).

En la Figura 49 se muestra imágenes de inmunofluorescencia para visualizar la expresión del receptor P2Y₄ y del Factor de Von Willebrand en una VIP de una rata con HAP-MCT.

La imagen en contraste de fase (Figura 49-A) muestra la estructura del vaso, visualizando la pared del vaso (flechas rojas) y el lumen en el centro (flecha negra).

La marca de DAPI en la Figura 49-B coincide con el espesor de la pared del vaso (flechas trojas) observado en el contraste de fase.

En la Figura 49-C se observa la marca del Factor de Von Willebrand, que coincide con el espesor de la pared del vaso de acuerdo a lo mostrado en la imagen en contraste de fase y la celularidad del DAPI, pero no presenta un patrón de distribución endotelial.

En la Figura 49-D se observa la marca del receptor P2Y₄ en la pared de la VIP, sin embargo existe mayor señal que predomina en el interior de la pared, cerca del lumen (flechas blancas). En la Figura 50 se muestra el Merge de la señal del Factor de Von Willebrand y el receptor P2Y₄ (flechas blancas) y la marca del receptor de manera independiente (flechas amarillas).

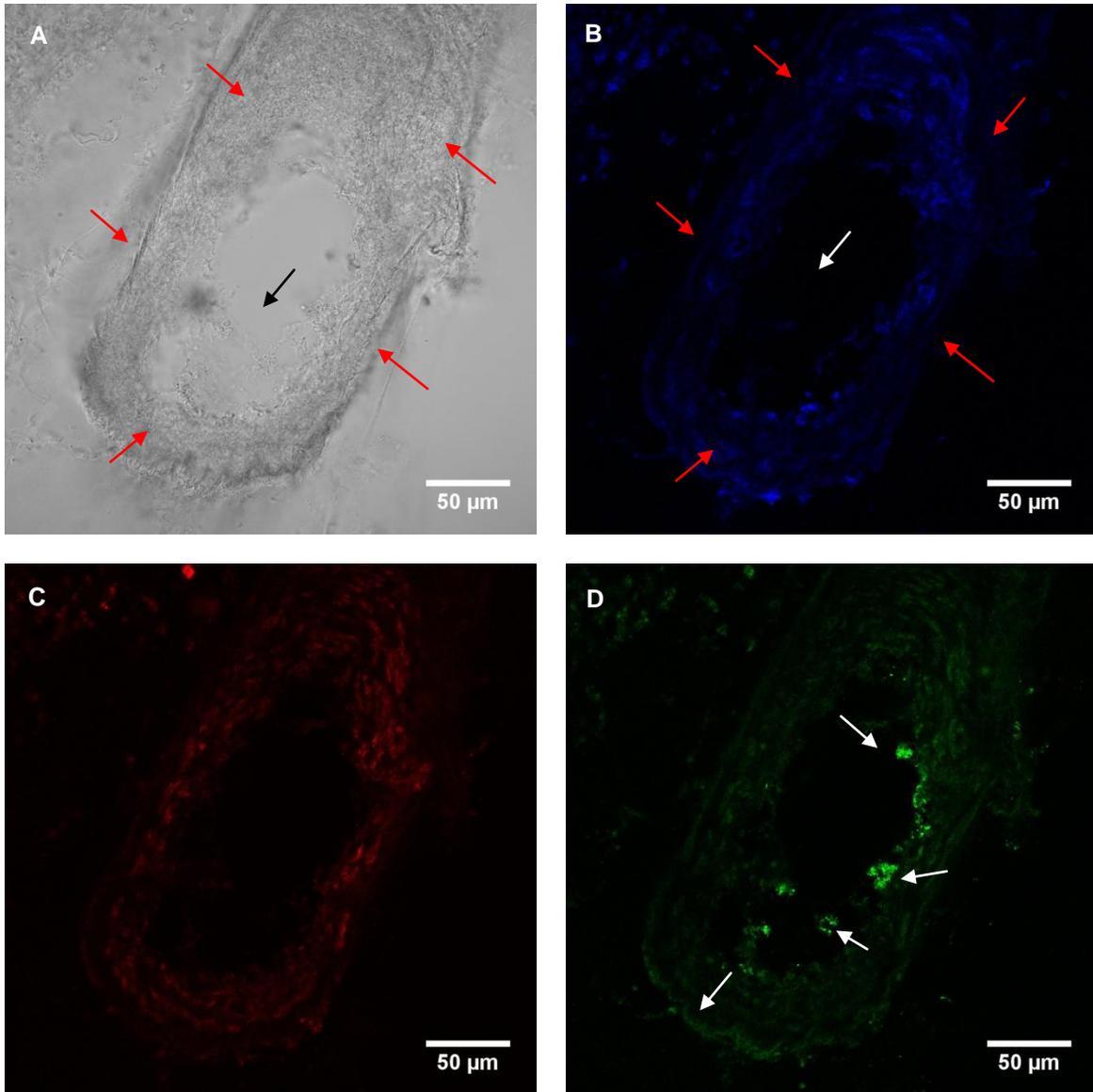


Figura 49. Imágenes de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. (A) Contraste de fase, (B) DAPI, (C) Factor de von Willebrand, (D) receptor P2Y₄

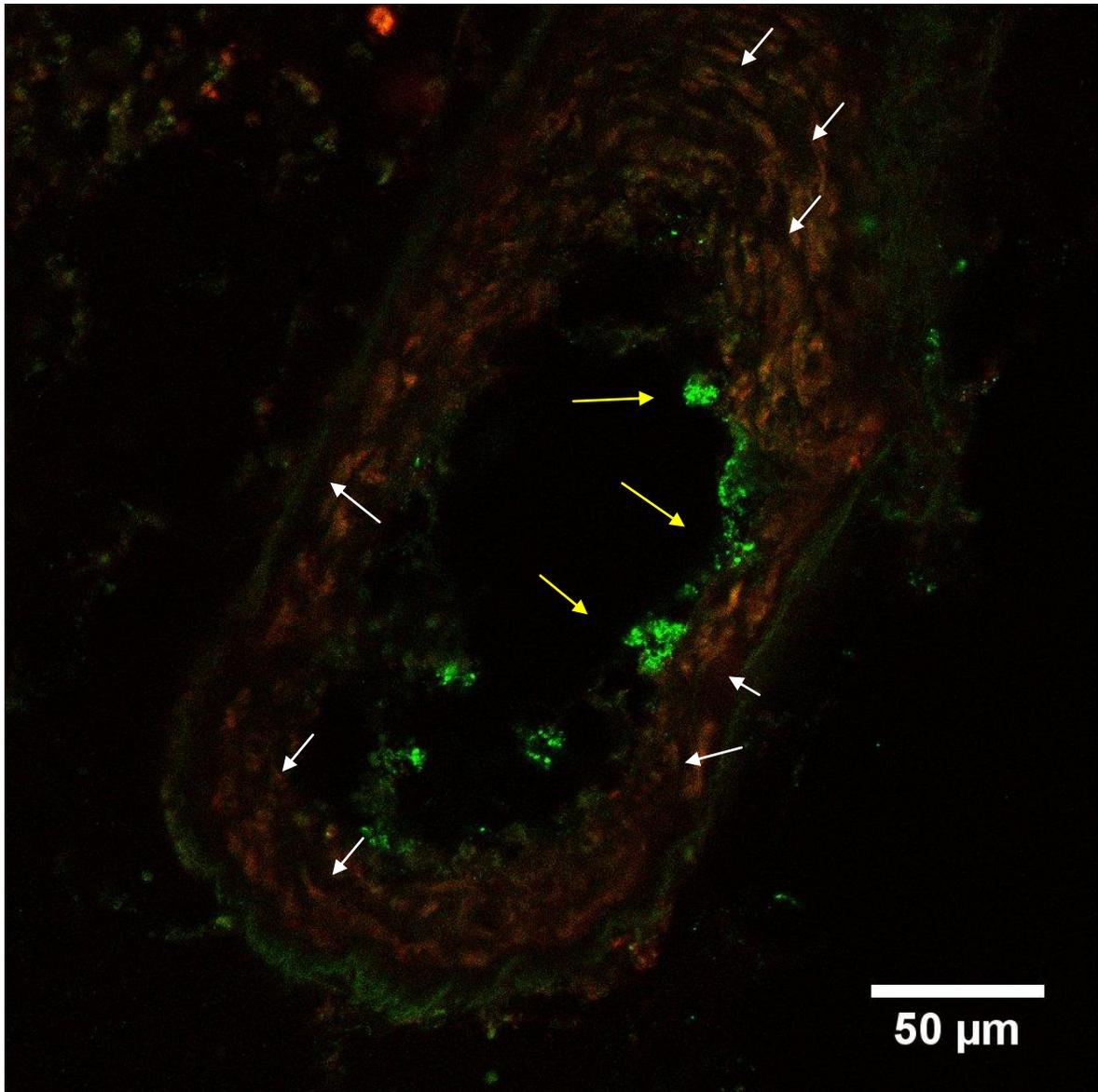


Figura 50. Imagen de Inmunofluorescencia realizada en una VIP de una rata con HAP-MCT. Merge de la presencia del receptor $P2Y_4$, (Figura 49-B) Factor de von Willebrand (Figura 49-C).

8. DISCUSIÓN

La HAP es una enfermedad vascular que lleva a insuficiencia cardíaca y muerte prematura. La prevalencia estimada de la HAP es de en 15 a 50 personas por millón de habitante, pero esto es probablemente una subestimación (Sutendra et al., 2013).

La calidad de vida de los pacientes con HAP ha mejorado en los últimos años gracias a las terapias actuales, sin embargo ninguna puede revertir o curar la enfermedad. La esperanza está en los estudios en ciencias básicas y preclínicos sobre HAP, pero su aplicación en humanos ha sido muy lenta. Aún existe el reto para los científicos del campo de la HAP, en la tarea de seguir buscando nuevos mecanismos involucrados en la enfermedad (Sutendra et al., 2013).

Estos resultados demuestran que UTP produce un aumento en el tono de VIP de ratas SD y desencadena vasoconstricción exacerbada en las VIP provenientes de ratas con HAP-MCT como se planteó en la hipótesis. Podemos afirmar que UTP extracelular participa como un importante agente vasoconstrictor en el modelo de Hipertensión Arterial Pulmonar inducida por MCT (Figura 14). Los avances recientes en las terapias que utilizan medicamentos relacionados con la señalización purinérgica en una amplia gama de condiciones patológicas (Burnstock et al., 2006), dan a estos resultados del campo de la ciencia básica una proyección clínica.

Las venas pulmonares se han visto principalmente como vasos de conducción; sin embargo, durante las últimas décadas, una gran cantidad de

evidencia acumulada indica que las venas pulmonares pueden exhibir actividad vasomotora importante (Gao et al., 2005). Se ha descrito la existencia de pacientes con HVP y se postula que en estos pacientes esta alteración podría ser relevante en la generación de HAP. El mecanismo que explica esta hipótesis es la transmisión pasiva de la presión del segmento venoso, hacia el lecho arterial con impacto en la RVP. Se postula que podría ocurrir vasoconstricción miogénica, asociada a estrés de pared, dando cuenta del aumento del tono, e indirectamente estimulando el remodelamiento vascular (Kulik 2014). Nuestros resultados muestran que las VIP de ratas control y tratadas con MCT desarrollan actividad contráctil, y que en el último esta respuesta se encuentra exacerbada. De acuerdo a lo planteado por Kulik(Kulik 2014), la señalización purinérgica puede ser un agente activo en la generación de venoconstricción en el segmento venoso produciendo la elevación de la PAP y aumento de la RVP en esta condición patológica.

En este estudio se propone a la señalización purinérgica como una cuarta vía involucrada en la enfermedad, ya que su contribución en la fisiopatología de la HAP no ha sido completamente aclarada. Por ejemplo, se ha mostrado disminución de la expresión de CD39 en pacientes con HAP, aunque el significado de esta desregulación no está dilucidado (Visovatti et al., 2016).

Aunque los receptores P2Y₂ y P2Y₄ responden a UTP y sus análogos(Ko H 2008), lamentablemente no existe una gama amplia de agonistas y antagonistas purinérgicos, que permitan discriminar con mayor detalle entre la actividad de estos receptores.

AR-C118925XX es el único antagonista selectivo del receptor P2Y₂ (Meghani et al., 2002). La especificidad de este antagonista se demostró ya que es inactivo contra un panel de 37 receptores humanos, excepto el receptor P2Y₂ (Kemp et al., 2004). De acuerdo a la selectividad descrita en la literatura para este antagonista, hemos examinado la contribución de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en la respuesta contráctil inducida por UTP.

AR-C118925XX produce inhibición parcial de la respuesta contráctil inducida por UTP en VIP de ratas control, en cambio en VIP de ratas con HAP-MCT AR-C118925XX no ejerce efecto inhibitorio frente a la respuesta contráctil de UTP. Si bien estos resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas, sugieren que existe igual participación de los receptores en VIP de ratas control (Figura 16) y en las VIP de ratas con HAP-MCT existe mayor contribución aparente de los receptores P2Y₄ (Figura 20).

Burnstock explica que una de las principales razones por las que aún no existen más terapias en relación a los receptores purinérgicos es la escasez de agonistas y antagonistas específicos para el subtipo de receptores (Burnstock et al., 2006). Estos experimentos orientan a continuar el estudio con AR-C118925XX como una nueva alternativa terapéutica para un receptor purinérgico específico.

Thio-UTP se ha descrito como un agonista que presenta alta afinidad, incluso como selectivo para el receptor P2Y₂, (Ko et al., 2008). De acuerdo a este antecedente se utilizó como una segunda estrategia para evaluar al receptor P2Y₂.

En VIP del grupo control AR-C118925XX inhibe casi completamente la actividad contráctil inducida por Thio-UTP, lo que coincide con las afinidades descritas para ambos, agonista y antagonista, por el receptor en cuestión (Ko et al., 2008, Kemp et al., 2004).

En VIP de ratas tratadas con MCT, AR-C118925XX inhibe parcialmente la actividad contráctil inducida por Thio-UTP. Este resultado es controversial con las afinidades descritas para ambos.

El EC_{50} descrito para que Thio-UTP estimule el receptor $P2Y_2$ es del orden de los nanomolar, y la concentración utilizada para este agonista en los experimentos en VMCF fue de 10 μ M. Si bien los experimentos con Thio-UTP son complementarios, no son concluyentes ya que no se realizó la construcción de una curva dosis respuesta para este agonista como en el caso de UTP, que permite discriminar la concentración aproximada para un efecto deseado en el modelo de rebanada de pulmón en VMCF.

En la actualidad el objetivo principal de la investigación en el campo de las enfermedades de pulmón es la identificación de los eventos moleculares a nivel celular que se manifiestan como alteraciones de las vías respiratorias o la función pulmonar. La preparación de rebanadas de pulmón permite estudiar los cambios en la circulación pulmonar en respuesta a diferentes estímulos tales como la hipoxia o agonistas vasoactivos. Si bien el modelo *ex vivo* de rebanada de pulmón permite correlacionar los eventos fisiológicos a gran escala, sus características

macroscópicas dificultan la evaluación exhaustiva de los procesos microscópicos involucrados. Durante mucho tiempo se han realizado estudios por medio de células en cultivo. Sin embargo, estas células aisladas carecen de muchas de sus reales características presentes cuando son parte de los tejidos de los órganos. La extrapolación de cómo los eventos celulares determinan con precisión los cambios fisiológicos a nivel del órgano es frecuentemente especulativo. El modelo *ex vivo* de rebanada de pulmón es una solución para el acoplamiento de estas alternativas experimentales. La rebanada de pulmón se caracteriza por conservar muchas características macroscópicas de los pulmones al mismo tiempo que da información sobre el comportamiento de las actividades microscópicas de la célula. Si bien su uso es limitado para el análisis bioquímico o genético, la arquitectura multicelular de las rebanadas de pulmón ofrece la capacidad única para correlacionar la fisiología específica de la célula con la fisiología de órganos (Sanderson et al., 2011).

Los resultados obtenidos de las imágenes de Inmunofluorescencia Indirecta muestran la presencia de los receptores purinérgicos implicados en la respuesta a UTP en el músculo liso de VIP tanto en ratas control como con HAP inducida por MCT. A partir de las imágenes obtenidas no podemos asegurar que los receptores P2Y₂ y P2Y₄ se encuentran en el compartimento endotelial, ya que la marca del Factor de Von Willebrand no presenta un patrón como tal. A pesar de esto, se observa presencia de ambos receptores en las VIP y sobre todo en el músculo liso de éstas.

Estos resultados son atractivos para continuar el estudio cuantitativo de la

expresión de receptores purinérgicos en la circulación pulmonar, como parte de los mediadores que controlan el tono a este nivel. Su presencia podría tener implicancia en la generación y progresión de la HAP.

La presencia de estos receptores puede involucrar mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar, donde el sistema venoso puede ser como un componente importante en el incremento de la resistencia vascular pulmonar. La verificación de estos resultados sugiere un nuevo mecanismo involucrado en la HAP, orientando el estudio con proyección clínica, con el fin de obtener nuevas terapias para combatir el curso de la enfermedad, mejorar la sobrevida y la calidad de vida de estos pacientes.

9. CONCLUSIÓN

1. UTP es un agonista vasoconstrictor en VIP de ratas control y en VIP de ratas con HAP-MCT produce vasoconstricción exacerbada.
2. Los resultados de los experimentos de inhibición con AR-C118925XX, no muestran diferencias en la contribución de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ en la respuesta contráctil inducida por UTP en VIP de ratas control y con HAP-MCT.
3. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran expresión de ambos receptores, P2Y₂ y P2Y₄, en la capa media de VIP de ratas control y con HAP-MCT.

Bibliografía

Abdulqawi R.; Dockry K.; Holt G.; Layton B.; McCarthy A.; Ford J.; Smith J. "P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study." *Lancet*. 385(9974):1198-205, 2015.

Altieri R.; Olson J.; Gillespie M. "Altered Pulmonary Vascular Smooth Muscle Responsiveness in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 1985.

Ando J.; Yamamoto K.; "Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress". *Circ J*. 73:1983 mec, 2009.

Archer S.; Rich S. "Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*. 102(22):2781-91, 2000.

Babokhov P.; Sanyaolu A.; Oyibo W.; Fagbenro-Beyioku A.; Iriemenam N. "A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis". *Pathog Glob Health*. 107(5):242-52., 2013.

Bevacqua R.; Perrone S. "Avances futuros en la hipertensiy strategies for th". *Insuf Card*. 4: 185-190, 2013.

Bivalacqua TJ.; Champion HC.; Shah M.; De Witt BJ.; Inscho EW.; Kadowitz PJ. "Comparative responses to alpha,beta-methylene-ATP in cat pulmonary, mesenteric, and hindquarter vascular beds". *J Appl Physiol*. 93(4):1287-95, 2002.

Bodin P.; Burnstock G. "Evidence That Release of Adenosine Triphosphate From Endothelial Cells During Increased Shear Stress Is Vesicular". *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 38(6):900-8, 2001.

Burnstock G.; Ralevic V. "Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease". *Pharmacological Reviews*. 66:102014:, 2014.

Burnstock, G. "Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling". *Pharmacol Rev*. 58:58acol Revy.

Burnstock G. "Purinergic regulation of vascular tone and remodelling". *Autonomic & Autacoid Pharmacology*. 29(3):63-72, 2009.

Burnstock., G. "Purine and pyrimidine receptors". *Cell. Mol. Life Sci*. 64(12):1471-83, 2007.

Buermans H.; Redout E.; Schiel A.; Musters R.; Zuidwijk M.; Eijk P.; Hardeveld C.;

Kasanmoentalib S.; Visser F.; Ylstra B.; Simonides W. "Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure". *Physiol. Genomics*. 21:314-323, 2005.

Cosentino S.; Banfi C.; Burbiel J.; Luo H.; Tremoli E.; Abbracchio M. "Cardiomyocyte death induced by ischaemic/hypoxic stress is differentially affected by distinct purinergic P2 receptors". *J. Cell. Mol. Med.* (5):1074-84, 2012.

Chen G.; Suzuki H. "Direct and Indirect Actions of Acetylcholine and Histamine on Intrapulmonary Artery and Vein Muscles of the Rat". *The Japanese Journal of Physiology*. 39(1):51-65, 1989.

Chootip K.; Ness K.; Wang Y.; Gurney A.; Kennedy C. "Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation". *Br J Pharmacol*. 137(5):637-46, 2002.

Christman B.; McPherson C.; Newman J.; King G.; Bernard G.; Groves B.; Loyd J. "An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension". *N Engl J Med*. 327(2):70-5, 1992.

Cool C.; Stewart J.; Werahera P.; Miller G.; Williams R.; Voelkel N.; Tuder R. "Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth". *Am J Pathol*. 155(2):411-9, 1999.

Davie N.; Crossno J.; Frid M. "Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286:668 –78, 2004.

Davis M.; Hill M. "Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response". *Physiological Reviews*. 79(2):387-423, 1999.

Ding X.; Murray P. "Regulation of pulmonary venous tone in response to muscarinic receptor activation". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288, L131-L140, 2005.

Dinh Xuan A.; Higenbottam T.; Clelland C.; Pepke-Zaba J.; Wells F.; Wallwork J. "Acetylcholine and adenosine diphosphate cause endothelium-dependent relaxation of isolated human pulmonary arteries". *Eur Respir J*. 3:633:pir, 1990.

Dubyak GR. "Both sides now: multiple interactions of ATP with pannexin-1 hemichannels. Focus on "A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP". *Am J Physiol Cell Physiol*. 296(2):C235-41, 2009.

Endo H.; Mifune H.; Maeda S.; Kimura J.; Yamada J.; Rerkamnuaychoke W.; Chungsamarnyart N.; Ogawa K.; Kurohmaru M.; Hayashi Y.; Nishida T. "Cardiac-like musculature of the intrapulmonary venous wall of the long-clawed shrew (*Sorex unguiculatus*), common tree shrew (*Tupaia glis*) and common marmoset (*Callithrix jacchus*)". *Anat Rec.* 247(1):46-52, 1997.

Faigle M.; Seessle J.; Zug S.; El Kasmi K.; Eltzschig H. "ATP Release from Vascular Endothelia Occurs Across Cx43 Hemichannels and Is Attenuated during Hypoxia". *PLoS One.* 3(7):e2801, 2008.

Franchi F.; Rollini F.; Park Y.; Angiolillo D. "Novel Antiplatelet Agents: the Current State and What is Coming Down the Pike". *Progress in Cardiovascular Diseases.* S0033-0620(15)00068-7, 2015.

Fraser R. "Histology and Gross Anatomy of the Respiratory Tract. Physiological basis of Respiratory Disease". Capítulo 1 del Libro "Physiological Basis of Respiratory Disease". BC Decker Inc, 2005.

Fryer A.; Christopoulos A.; Nathanson N. "Muscarinic Receptors". Springer, 2012.

Furchgott R.; Vanhoutte P. "Endothelium-derived relaxing and contracting factors". *The FASEB Journal.* (9):2007-18, 1989.

Furchgott R. "Role of Endothelium in Responses of Vascular". *Circulation Research.* 53(5):557-73, 1983.

Gali3.); Ghofrani A. "New horizons in pulmonary arterial hypertension therapies". *Eur Respir Rev.* 22: 503ir R, 2013.

Galley H.; Webster N. "Physiology of the endothelium". *British Journal of Anaesthesia.* 93(1):105-13, 2004.

Gao Y.; Raj JU. "Role of veins in regulation of pulmonary circulation". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288(2):L213-26, 2005.

Giaid A.; Saleh D. "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension". *N Engl J Med.* 333(4):214-21, 1995.

Giaid A.; Yanagisawa M.; Langleben D.; Michel R.; Levy R.; Shennib H.; Kimura S.; Masaki T.; Duguid W.; Stewart D. "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension". *N Engl J Med.* 328(24):1732-9, 1993.

Gruetter C.; Lemke S. "Comparison of endothelium-dependent relaxation in bovine intrapulmonary artery and vein by acetylcholine and A23187". *J Pharmacol Exp Ther.* 238: 1055-1062, 1986.

Guns P.; Van Assche T.; Fransen P.; Robaye B.; Boeynaems J.; Bult H. "Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y2-deficient mice". *Br J Pharmacol.* 147(5):569-74, 2006.

Hachulla E.; Gressin V.; Guillevin L.; Carpentier P.; Diot E.; Sibilia J.; Kahan A.; Cabane J.; Frances C.; Launay D.; Mouthon L.; Allanore Y.; Phong K.; Clerson P.; de Groote P.; Humbert M. "Early Detection of Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis". *Arthritis Rheum.* 52(12):3792-800, 2005.

Hartley S.; Kato K.; Salter K.; Kozlowski R. "Functional evidence for a novel suramin-insensitive pyrimidine receptor in rat small pulmonary arteries". *Circ Res.* 83(9):940-6, 1998.

Hottinger D.; Beebe D.; Kozhimannil T.; Prielipp R.; Belani K. "Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review". *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology.* (4):462-71, 2014.

Hass14.-71 Anaesthesiology Clinical Pharmacology reviewmidine receptor in rat small pulmonary arteries and A23187free shrew (*Tupaia glis*) ation in the pulmonary vascular bed of the rat.ot*Br J Pharmacol* , 1993: 109:466sthes

Hass93: 109.:; Burnstock G. "Interacting roles of nitric oxide and ATP in the pulmonary circulation of the rat". *Br J Pharmacol.* 114:846rmac, 1995.

Helenius M.; Vattulainen S.; Orcholski M.; Aho J.; Komulainen A.; Taimen P.; Wang L.; de Jesus Perez V.; Koskenvuo J.; Alastalo T. "Suppression of endothelial CD39/ENTPD1 is associated with pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 308(10):L1046-57, 2014.

Herv14-.; Launay J.; Scrobohaci M.; Brenot F.; Simonneau G.; Petitpretz P.; Poubeau P.; Cerrina J.; Duroux P.; Drouet L. "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension". *Am J Med.* (3):249-54, 1995.

Hoepfer M.; Bogaard H.; Condliffe R.; Frantz R.; Khanna D.; Kurzyna M.; Langleben D.; Manes A.; Satoh T.; Torres F.; Wilkins M.; Badesch D. "Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension". *Journal of the American College of Cardiology.* 62(25 Suppl):D42-50, 2013.

Hosoyamada Y.; Ichimura K.; Koizumi K.; Sakai T. "Structural organization of

pulmonary veins in the rat lung, with special emphasis on the musculature consisting of cardiac and smooth muscles". *Anat Sci Int.* 85(3):152-9, 2010.

Humbert M.; Morrell N.; Archer S.; Stenmark K.; MacLean M.; Lang I.; Christman B.; Weir E.; Eickelberg O.; Voelkel N.; Rabinovitch M. "Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension". *Journal of the American College of Cardiology.* 43, No. 12 Suppl S, 2004.

Hwan Ahn J.; Kang B.; Hong S.; Lee J.; Lee JS.; Oh Y.; Lee SD.. "Clinical Characteristics and Survival of Korean Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients Based on Vasoreactivity". *Korean Med Sci.* 29: 1665-1671, 2014.

Inoue T.; Kannan MS. "Nonadrenergic and noncholinergic excitatory neurotransmission in rat intrapulmonary artery". *Am J Physiol.* 254(6 Pt 2):H1142-8, 1998.

Ivanova A.; Koa.; Liesbet Cosyn.; Maddileti S.; Besada P.; Fricks I.; Costanzi S.; Harden T., Van Calenbergh S.; Jacobson K.; "Molecular Modeling of the Human P2Y2 Receptor and Design of a Selective Agonist, 2'-Amino-2'-deoxy-2-thio-UTP". *J Med Chem.* 50(6):1166-76, 2007.

Jacobson K.; Costanzi S.; Ivanov A.; Tchilibon S.; Besada P.; Gao Z.; Maddileti S.; Harden T. "Structure activity and molecular modeling analyses of ribose- and base-modified uridine 5'-triphosphate analogues at the human P2Y2 and P2Y4 receptors". *Biochem Pharmacol.* 71(4):540-9, 2006.

Jeffery T.; Morrell N. "Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension". *Prog Cardiovasc Dis.* 45:173:202, 2002.

Jiang F.; Guang L.; Rand M. "Mechanisms of nitric oxide-independent relaxations induced by carbachol and acetylcholine in rat isolated renal arteries". *British Journal of Pharmacology.* 130(6):1191-200, 2000.

Joiner P.; Kadowitz P.; Hughes J.; Hyman A. "NE and ACh responses of intrapulmonary vessels from dog, swine, sheep, and man". *American Journal of Physiology.* 228(6):1821-7, 1975.

Jones J.; Mendes L.; Rudd A.; Russo G.; Loscalzo J.; Zhang Y. "Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* H3642: ys, 2002.

Kay JM.; Harris P.; Heath D. "Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion

of *Crotalaria spectabilis* seeds". *Thorax*. 22, 176, 1967.

Keegan A.; Morecroft I.; Smillie D.; Hicks MN.; MacLean MR. "Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935". *Circ Res*. 89(12):1231-9, 2001.

Kemp P.; Sugar R.; Jackson A. "Nucleotide-Mediated Mucin Secretion from Differentiated Human Bronchial Epithelial Cells". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 31(4):446-55, 2004.

Ko H.; Carter RL.; Cosyn L.; Petrelli R.; de Castro S.; Besada P.; Zhou Y.; Cappellacci L.; Franchetti P.; Grifantini M.; Van Calenbergh S.; Harden TK.; Jacobson KA. "Synthesis and potency of novel uracil nucleotides and derivatives as P2Y2 and P2Y6 receptor agonists". *Bioorg Med Chem*. 16(12):6319-32, 2008.

Kulik T. "Pulmonary hypertension caused by pulmonary venous hypertension". *Pulm Circ*. 4(4):581-95, 2014.

Kuo I.; Ehrlich B. "Signaling in Muscle Contraction". *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7(2):a006023, 2015.

Kylhammar D.; Bune L.; Rune L.r D., "P2Y1 and P2Y12 receptors in hypoxia-and adenosine diphosphate-induced pulmonary vasoconstriction in vivo in the pig". *Eur J Appl Physiol*. 114(9):1995-2006, 2014.

Lazarowski ER. "Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release". *Purinergic Signal*. 8(3):359-73, 2012.

Lee H.; Chang Kim K.; Cho M.; Suh S.; Hong Y. "Modafinil improves monocrotaline-induced pulmonary hypertension rat model". *nature*. 80(1):119-27, 2015.

Lee S.; Shroyer K.; Markham N.; Cool C.; Voelkel N.; Tuder R. "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension". *J Clin Invest*. 101(5):927-34, 1998.

Liu S.; Barnes P. "Role of endothelium in the control of pulmonary vascular tone". *Endothelium*. 2, pp 11-33, 1994.

Liu S.; Crawley D.; Evans T.; Barnes P. "Endothelium-dependent nonadrenergic, noncholinergic neural relaxation in guinea pig pulmonary artery". *Pharmacol Exp Ther*. 260:5411 Ex, 1992.

Liu S.; McCormack D.; Evans T.; Barnes P. "Characterization and distribution of P2-purinoreceptor subtypes in rat pulmonary vessels". *J Pharmacol Exp Ther.* 251:1204col E, 1989.

Lohman A.; Billaud M.; Isakson B. "Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall". *Cardiovasc Res.* 95(3):269-80, 2012.

MacLean M.; Deuchar G.; Hicks M.; Morecroft I.; Shen S.; Sheward J.; Colston J.; Loughlin L.; Nilsen M.; Dempsie Y.; Harmar A. "Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension". *Circulation.* 109(17):2150-5, 2004.

MacLean M.; Herve P.; Eddahibi S.; Adnot S. "5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension". *Br J Pharmacol.* 131(2):161-8, 2000.

Mam V.; Tanbe AF.; Vitali S.; Arons E.; Christou H.; Khalil R. "Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats". *J Pharmacol Exp Ther.* 332(2):455-62, 2010.

Marcos E.; Adnot S.; Pham M.; Nosjean A.; Raffestin B.; Hamon M.; Eddahibi S. "Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension". *Am J Respir Crit Care Med.* 168(4):487-93, 2003.

McLaughlin V.; Badesch D.; Delcroix M.; Fleming T.; Gaine S.; Galie S.; Gibbs J.; Kim N.; Oudiz R.; Peacock A.; Provencher S.; Sitbon O.; Tapson V.; Seeger W. "End points and clinical trial design in pulmonary arterial hypertension". *J Am Coll Cardiol.* 54(1 Suppl):S97-107, 2009.

Meghani P. "The design of P2Y2 antagonist for the treatment of inflammatory diseases". *224th ACS National Meeting.* 2002.

Michelakis E.; McMurtry M.; Wu X.; Dyck J.; Moudgil R.; Hopkins T.; Lopaschuk G.; Puttagunta L.; Waite R.; Archer S. "Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels". *Circulation.* 105(2):244-50, 2002.

Michelakis E.; Tymchak W.; Noga M.; Webster L.; Wu X.; Lien D.; Wang S.; Modry D.; Archer S. "Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension".

Circulation. 2066-9, 2003 .

Michelakis E.; Sutendra G.; Evangelos D. "Pulmonary Arterial Hypertension: Challenges in Translational Research and a Vision for Change". *Sci Transl Med* Vol. 5, Issue 208, p. 208sr5, 2013.

Mitchell C.; Syed N.; Tengah A.; Gurney A.; Kennedy C. "Identification of contractile P2Y1, P2Y6, and P2Y12 receptors in rat intrapulmonary artery using selective ligands". *J Pharmacol Exp Ther.* 343:755acol, 2012.

Montani D.; Chaumais M.; Guignabert C.; Guignabert; Girerd B.; Jarerd ; Algalarrondo V.; Price L.; Savale L.; Sitbon O.; Simonneau G.; Humbert M. "Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension". *Pharmacology & Therapeutics.* 141: 172-191, 2014.

Morecroft I.; Heeley R.; Prentice H.; Kirk A.; MacLean M. "5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT1B receptor". *Br J Pharmacol.* 128(3):730-4, 1999.

North R.; Barnard E. "Nucleotide receptors". *Current Opinion in Neurobiology.* (3):346-57, 1997.

Okada K.; Tanaka Y.; Bernstein M.; Zhang W.; Patterson G.; Botney M. "Pulmonary Hemodynamics Modify the Rat Pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension". *Am J Pathol.* 151(4):1019-25, 1997.

Paes de Almeida O.; Bohm C.; de Paula Carvalho M.; Paes de Carvalho A. "The cardiac muscle in the pulmonary vein of the rat: a morphological and electrophysiological study". *J Morphol.* 145(4):409-33, 1975.

Peacock A.; Murphy N.; McMurray J.; Caballero L.; Stewart S. "An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension". *Eur Respir J.* 30(1):104-9, 2007.

Petkov V.; Mosgoeller W.; Ziesche R.; Raderer M.; Stiebellehner L.; Vonbank K.; Funk G.; Hamilton G.; Novotny C.; Burian B.; Block L. "Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension". *J Clin Invest.* 111(9):1339-46, 2003.

Raj J.; Chen P. "Micropuncture measurement of microvascular pressures in isolated lamb lungs during hypoxia". *Circ Res.* 59(4):398-404, 1986.

Rajkumar R.; Konishi K.; Richards T.; Ishizawa D.; Wiechert A.; Kaminski N.; Ahmad F. "Genomewide RNA expression profiling in lung identifies distinct signatures in idiopathic pulmonary arterial hypertension and secondary pulmonary hypertension". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(4):H1235-48, 2010.

Rosenberg H.; Rabinovitch M. "Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension". *Am J Physiol.* 255(6 Pt 2):H1484-91, 1988.

Rubino A.; Ziabary L.; Burnstock G. "Regulation of vascular tone by UTP and UDP in isolated rat intrapulmonary arteries". *Eur J Pharmacol.* 370(2):139-43, 1999.

Rubino A.; Burnstock G. "Evidence for a P2-purinoceptor mediating vasoconstriction by UTP, ATP and related nucleotides in the isolated pulmonary vascular bed of the rat". *Br J Pharmacol.* 118(6):1415-20, 1996.

Ryan J.; Bloch K.; Archer S. "Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisationides in the isolated pulmonar". *Int J Clin Pract.* 65 (Suppl. 172), 2011.

Sadler J. "Biochemistry and genetics of Von Willebrand Factor". *Annual Review of Biochemistry.* 67:395-424, 1998.

Sanderson M. "Exploring lung physiology in health and disease with lung slices". *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* (5):452-65, 2011.

Shi W.; Eidelman D.; Michel R. "Differential relaxant responses of pulmonary arteries and veins in lung explants of guinea pigs". *J Appl Physiol.* 83: 1476-1481, 1997.

Simonneau G.; Gatzoulis M.; Adatia I.; Celermajer D.; Denton C.; Ghofrani A.; Gomez Sanchez MA.; Kumar K.; Landzberg M.; Machado R.; Olschewski H.; Robbins I.; Souza R. "Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension". *Journal of the American College of Cardiology.* 62, No. 25, Suppl D, 2013.

Souza R.; Jardim C.; Humbert M. "Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension". *Semin Respir Crit Care Med.* 34:560espi, 2013.

Sprague R.; Ellsworth M.; Stephenson A.; Lonigro A. "ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation". *Am J Physiol.* 271:H2717iol bl, 1996.

Stenmark K.; Gerasimovskaya E.; Nemenoff R.; Das M. "Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling". *Chest.* 122:326Sctiv, 2002.

Sutendra G.; Michelakis E. "Pulmonary Arterial Hypertension: Challenges in

Translational Research and a Vision for Change". *Cardiovascular Disease*. 5(208):208sr5, 2013.

Toga H.; Bansal V.; Raj J. "Differential responses of ovine intrapulmonary arteries and veins to acetylcholine". *Respiration Physiology*. 104(2-3):197-204, 1996.

Triggle F. "Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery". *British Journal of Pharmacology*. 131, 521 - 529, 2000.

Tuder R.; Cool C.; Geraci M.; Wang J.; Abman S.; Wright L.; Badesch D.; Voelkel N. "Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension". *Am J Respir Crit Care Med*. 159(6):1925-32, 1999.

Urboniene D.; Haber I.; Fang Y.; Thenappan T.; Archer S. "Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299(3):L401-12, 2010.

Visovatti S.; Hyman M.; Goonewardena S.; Anyanwu A.; Kanthi Y.; Robichaud P.; Wang J.; Petrovic-Djergovic D.; Rattan R.; Burant C.; Pinsky D. "Purinergic dysregulation in pulmonary hypertension". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 311(1):H286-98, 2016.

Webb R.; Bohr D. "Regulation of Vascular Tone, Molecular Mechanisms". *Progress in Cardiovascular Diseases*. (3):213-42, 1981.

Yamamoto K.; Sokabe T.; Ohura N.; Nakatsuka H.; Kamiya A.; Ando J. "Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells". *J Physiol Heart Circ Physiol*. 285:H793l Hea, 2003.

Yeager M.; Halley G.; Golpon H.; Voelkel N.; Tuder R. "Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension". *Circ Res*. 19;88(1):E2-E11, 2001.

Yegutkin G. "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade". *Biochim Biophys Acta*. 1783(5):673-94, 2008.

Yoshiyuki R.; Tanaka R.; Fukushima R.; Machida N. "Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension". *Experimental Animals*. 65(3):215-22, 2016.

Zhao Y.; Packer C.; Rhoades R. "Pulmonary vein contracts in response to hypoxia". *Am J Physiol.* 265(1 Pt 1):L87-92, 1993.

Zhao Y.; Vanhoutte P.; Leung S. "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS". *Journal of Pharmacological Sciences.* 129(2):83-94, 2015.

Zimmermann H.; Zebisch M.; Strisch M H"Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases". *Purinergic Signal.* 8(3):437-502, 2012.