



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

# **ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR PULMONAR MEDIADA POR GUANOSIL MONO FOSFATO CÍCLICO EN NEONATOS DE OVEJA TRATADOS CON HEMINA**

Javiera Constanza Luisa Ferrada Díaz

Memoria para optar al título de Bioquímico

**Patrocinante**

Dr. Mario Chiong  
Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Director de Memoria**

Dr. Germán Ebersperger  
Programa de Fisiopatología  
Instituto Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Campus Oriente  
Universidad de Chile

Santiago, Chile

**2017**



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR  
PULMONAR MEDIADA POR cGMP EN NEONATOS DE  
OVEJA TRATADOS CON HEMINA”**

Javiera Constanza Luisa Ferrada Díaz

Memoria para optar al título de Bioquímico

**Patrocinante**

Dr. Mario Chiong  
Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Director de Memoria**

Dr. Germán Ebersperger  
Programa de Fisiopatología  
Instituto Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Campus Oriente  
Universidad de Chile Fisiopatología  
Facultad de Medicina sede Oriente  
Universidad de Chile

Santiago, Chile

**2017**

## DEDICATORIA.

*“Son nuestras elecciones (...) las que muestran lo que realmente somos, mucho más que nuestras habilidades”.*

- J.K. Rowling

A Cristóbal, que me ha enseñado que el amor es infinito, el tiempo fugaz y la fuerza inquebrantable.

A Felipe, por ser mis brazos y mis piernas cuando la energía bajaba y no me dejaba caminar.

A mis padres, por la paciencia en estos largos años de aprendizaje.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Más allá de la talla del “POR FIN”, quisiera decir un “GRACIAS”, a mi familia y amigos, por el apañe, la fuerza y el ánimo para seguir día a día, para no flaquear cuando la energía empezaba a fallar, gracias por ser parte de los momentos buenos, y los no tan buenos, gracias por quererme a mí y a mi familia como la propia, gracias por los carretes, los cumpleaños, los baby shower y matrimonios, y gracias también por esos abrazos sin preguntas y los retos necesarios.

Primero quiero agradecerles a mis amigos de la U, tanto de Cs. Químicas como de toda la Universidad, a la Cami Fierro, Nacho Lobos y Pablo Maturana, por ser los mejores partner en los inicios de la carrera, a la Feña, el Apu, Sapito, Max, Rafa, Leyla, Maca, Pancho, David, Óscar, Rodo y Briso, por hacer del 2011 uno de los años más memorables de mi vida, por la amistad incondicional y los turismo aventura. A la Morgui por ser mi gemela de otra mamá, por apañarme en las ñoñerías y ser la tía más bacán. Al Nacho, por ser el ejemplo vivo que las almas gemelas existen y tienen humor negro y muchos memes.

A la Maca, una de las cosas que agradeceré siempre de la IA eres tú, tu amistad ha sido fundamental y no tengo como agradecerte todo lo que has hecho por mí y mi familia.

A mis amigos de la vida, la Paula y Marshall, mi vecina y su compañero de inglés, gracias por las aventuras adolescentes y las juntas de adultos con poco tiempo.

A mis compañeros de laboratorio, a Beñaldo, el traficante número uno de comida y el partner de copuchas, a Ismael, por su largas conversaciones y consejos, al JC, por ser el mejor, sin ti el laboratorio no funciona y te estaré eternamente agradecida de la buena onda y la disposición. Al Tato, por la música noventera, los puchos con piscola y los retos por el orden. A la Rocío, por las conversaciones y las risas, al Seba por la buena onda y los puchos en Lluta, a Roberto, por ser mi jefe de práctica, por los almuerzos bien conversados y las historias de la vida. Al Dr. Llanos, por siempre tener la disposición de ayudar, de enseñar y corregir. A Emilio, por las enseñanzas. Y por último, a Germán, por ser no sólo mi tutor, sino que el culpable

de mí ingreso a Bioquímica. Gracias, por ser una de las personas más importantes de mi vida, igual voy a hacer que la Sofi estudie Obstetricia en venganza jajajaja. Al Pipe, el compadre, por el apoyo, las cervezas seleccionadas y la amistad sin condiciones.

A la Dani, mi hermana, no me imagino una vida sin ti, lo hemos vivido todo juntas y estoy segura que nos espera la vida, eres uno de los pilares de mi vida y no podré jamás agradecerte tu apoyo, ser mi hombro y mi fanática número uno, te adoro de acá al cielo infinitas veces.

A Felipe, mi compañero de vida, por aparecer en el momento preciso, por todas las aventuras que hemos vivido y las que vendrán toda la vida, te elijo todos los días.

A Cristóbal, por ser el motor de mi vida, la razón para seguir y crecer, tu sonrisa es la recompensa más grande a todo el sacrificio. Esto es por ti.

A León, porque tú y tu hermano lo son todo, aún recuerdo la pequeña bolita caminante con ojos gigantes, gracias por quererme y aceptarme y por ser el hermano grande de mono más lindo.

Y por último a mi familia, a toda mi familia pero en específico a mis papas y mi hermano, por la eterna paciencia, las agarradas de moños y las dietas, no me imagino perteneciendo a ninguna otra familia. Gracias por las oportunidades y por enseñarme a siempre intentar empatizar con mi entorno, a no quedarme con sólo mi realidad, gracias por el gusto musical y por ser los mejores abuelos posibles para Mono.

Gracias a mi familia putativa, a la Miri, por ser la mejor cuñada y la tía más regalona, a René, el tío regalón, y por sobre todo a Ana María, por los consejos y el tiempo.

## INDICE.

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	1
GLOSARIO.....	3
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Aspectos básicos de la circulación pulmonaria y su regulación.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Aspectos básicos de la vasoconstricción:.....	13
1.1.2. Aspectos básicos de la vasorelajación:.....	16
<b>1.2. Activación de sGC y producción de cGMP.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Hemina como inductor de la hemoxigenasa y de su vía de señalización.....	19
<b>II HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>III METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
3.1. Descripción modelo animal.....	25
3.2. Protocolo experimental farmacológico y recolección de tejido.....	25
3.3. Determinación de las concentraciones de cGMP en tejido pulmonar. 26	
3.3.1. Determinación de la concentración de proteínas totales.....	26
3.3.2. Determinación del cGMP en tejido pulmonar.....	26
3.4. Mediciones <i>ex vivo</i> . Miografía de arterias pequeñas de resistencia pulmonar.....	28

3.5. Determinaciones <i>in vitro</i> . Análisis de los niveles de expresión de mRNA por PCR.....	31
3.6. Análisis estadístico.....	33
<b>IV RESULTADOS.</b> .....	<b>34</b>
4.1. Efecto de la administración de hemina en la producción de cGMP en el tejido pulmonar de RNOV.....	34
4.2. Efecto de la administración de hemina en la reactividad vascular de arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	35
4.2.1. Respuesta a K <sup>+</sup> .....	35
4.2.2. Respuesta Vasoconstrictora de las arterias pulmonares. ....	36
4.3. Efecto de la administración de hemina en la relajación mediada por el endotelio en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	40
4.4. Efecto de la administración de hemina en la relajación dependiente de eNOS en el endotelio, en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	43
4.5. Efecto de la administración de hemina en la relajación muscular dependiente de cGMP, en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. ....	47
4.5.1. Efecto de la estimulación de sGC. ....	47
4.5.2. Efecto en la función de PDE-5. ....	50
4.6. Efecto de la administración de hemina en la relajación dependiente de cGMP mediada por el músculo liso pulmonar. ....	51
<b>V DISCUSIÓN.</b> .....	<b>54</b>
<b>VI BIBLIOGRAFIA.</b> .....	<b>64</b>

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Composición solución Krebs y Krebs-K <sup>+</sup> .....	30
<b>Tabla 2.</b> Partidores para PCR .....	33

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Determinación de morfometría de arteria pulmonar. ....	11
<b>Figura 2.</b> Esquema de constricción de las células de músculo Liso (SMC).....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema de relajación de las SMC. Adaptado de Webb 2003. ....	16
<b>Figura 4.</b> Estructura de hemina. ....	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de conversión de hemina a biliverdina por hemoxigenasa-1. .....	21
<b>Figura 6.</b> Efectos de hemina en la hipertensión pulmonar de los RNOV de TA. ...	22
<b>Figura 7.</b> Efectos de hemina en los niveles de cGMP de aortas de ratones hipertensos y WKY.....	23
<b>Figura 8.</b> Curva estándar de cGMP con el protocolo ELISA. Biovision. ....	27
<b>Figura 9.</b> Efecto de la administración de hemina en la producción de cGMP en el tejido pulmonar de RNOV. ....	34
<b>Figura 10.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a KCl en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	35
<b>Figura 11.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a Serotonina (5-HT) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. ....	36
<b>Figura 12.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de 5HT1B/D, 5HT2A y 5HT2B en tejido pulmonar de RNOV.....	37
<b>Figura 13.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a endotelina (ET-1) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. ....	38
<b>Figura 14.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de receptores de endotelina (RETA y RETB) en tejidos pulmonares de RNOV. ....	39
<b>Figura 15.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a tromboxano (U-46619) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	39
<b>Figura 16.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de la síntesis de tromboxano (TXS) en tejidos pulmonares de RNOV.....	40
<b>Figura 17.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. ....	41
<b>Figura 18.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de bloquear con L-Name e Indometacina en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	42
<b>Figura 19.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de bloquear con L-Name en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	43
<b>Figura 20.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta a metacolina en presencia o ausencia del bloqueador L-Name en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.....	44

<b>Figura 21.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de bloquear con BEC en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	45
<b>Figura 22.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de eNOS y Arg-2 en tejido pulmonar de RNOV.....	46
<b>Figura 23.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a YC-1 en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	47
<b>Figura 24.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a SNP en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	48
<b>Figura 25.</b> Efecto de hemina en la expresión génica de sGC $\alpha$ y sGC $\beta$ en tejido pulmonar.....	49
<b>Figura 26.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a Sildenafil en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	50
<b>Figura 27.</b> Efecto de hemina en la expresión génica de PDE-5 en tejido pulmonar de RNOV.....	50
<b>Figura 28.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a 8Br-cGMP en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	51
<b>Figura 29.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de PKG-1 en tejido pulmonar de RNOV.....	52
<b>Figura 30.</b> Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a Fasudil en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.....	52
<b>Figura 31.</b> Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de ROCK2 en tejido pulmonar de RNOV.....	53
<b>Figura 32.</b> Evolución de la presión arterial pulmonar durante los días de tratamiento.	60
<b>Figura 33.</b> Diagrama de vías descritas de células endoteliales y musculares lisas de vasos arteriales pequeños de pulmón.....	63

## GLOSARIO.

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio intracelular
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>8 Br-cGMP</b>	Análogo de cGMP
<b>Arg-2</b>	Arginasa-2
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BEC</b>	Inhibidor de la arginasa
<b>BKCa</b>	Canal de potasio dependiente de calcio
<b>CCR</b>	Curva de concentración respuesta
<b>cGMP</b>	Guanosil monofosfato cíclico
<b>CRF</b>	Capacidad residual funcional
<b>DG</b>	Diacilglicerol
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que genera el 50% de la respuesta máxima
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ET-1</b>	Endotelina-1, vasoconstrictor
<b>Fasudil</b>	Inhibidor ROCK
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>GC</b>	Gasto cardiaco
<b>H<sub>4</sub>B</b>	Tetrahidrobiopterina
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>His<sup>105</sup></b>	Histidina 105
<b>HO</b>	Hemoxigenasa
<b>HPPN</b>	Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5 – trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>L-Arg</b>	L- Arginina

<b>L-Name</b>	Inhibidor eNOS
<b>MLCK</b>	Quinasa de la cadena liviana de la miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatasa de la cadena liviana de la miosina
<b>mPAP</b>	Presión arterial pulmonar media
<b>NOHLA</b>	N <sup>ω</sup> -hidroxil-L-Arginina
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>pD<sub>2</sub></b>	Logaritmo negativo de la concentración del agonista que genera el 50% de la respuesta máxima
<b>PDE-5</b>	Fosfodiesterasa 5
<b>pGC</b>	Guanilato ciclasa particulada
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PKG</b>	Quinasa dependiente de cGMP
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de oxígeno
<b>Rho-A</b>	GTPasa pequeña homóloga ras miembro A
<b>RIPA</b>	Ensayo de radioinmunoprecipitación
<b>Rmax</b>	Respuesta máxima
<b>RN</b>	Recién nacido
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNOV</b>	Recién nacido de oveja
<b>ROCK</b>	Quinasa dependiente de la proteína tipo Rho A
<b>RVP</b>	Resistencia vascular pulmonar
<b>SERT</b>	Transportador proteico de 5-HT
<b>sGC</b>	Guanilil ciclasa soluble
<b>SMC</b>	Células de músculo liso
<b>SNP</b>	Nitroprusiato de Sodio
<b>TA</b>	Tierra Alta
<b>TB</b>	Tierra Baja
<b>TBx</b>	Tromboxano

<b>TXS</b>	Tromboxano sintasa
<b>U46619</b>	Análogo de tromboxano A2
<b>VD</b>	Ventrículo derecho
<b>YC-1</b>	Activador de sGC
<b>μm</b>	Micrómetro

## RESUMEN.

La regulación de la circulación pulmonar en el periodo de perinatal es fundamental en la mantención de una presión arterial media (mPAP) y una resistencia vascular disminuida. Una desregulación del tono arterial pulmonar basal puede llevar a patologías tal como hipertensión pulmonar. Está descrito que la regulación del tono arterial pulmonar basal es resultado de un equilibrio de agentes constrictores y relajantes. La principal vía de transducción de señales involucrada según la bibliografía es la de sGC-cGMP-PKG, sGC es activado por compuestos gaseosos como NO (producido en la capa endotelial por eNOS) y en menor proporción por CO, que puede ser producido endógenamente por hemoxigenasas.

Existen antecedentes de la estimulación de la vía sGC-cGMP mediante la administración exógena de hemina en modelos de ovejas recién nacidas (RNOV) hipertensas. Se desconocen los efectos de la inducción de la respuesta dependiente de cGMP en un modelo de RNOV normotenso. Nuestra hipótesis es que la administración de hemina produce en la circulación pulmonar neonatal una exacerbación de la vía vasodilatadora dependiente de cGMP. Se utilizaron RNOV normotensas de nivel de mar, dividiéndolas en dos grupos al azar. Se les administró hemina (15mg/Kg peso) o control (Vehículo de NaOH 0,01N y PBS 1x) desde el 5<sup>to</sup> día de vida, durante 10 días. Al día 17 de vida se eutanizó y se recolectaron tejidos para el estudio funcional *ex vivo* con miografías de alambre de la vía dependiente de cGMP en arterias pequeñas de pulmón, e *in vitro* con PCR de la expresión génica de sus componentes y por ELISA para evaluar el contenido de cGMP del tejido pulmonar.

Los resultados muestran un aumento del contenido total de cGMP en el grupo con administración de hemina y aumento de la funcionalidad dependiente de cGMP por lo que se acepta la hipótesis de la memoria. Estos resultados contrastan con la respuesta *in vivo* donde no se modificó la mPAP entre ambos grupos. Se concluye que la regulación del tono vascular basal primordialmente no depende del equilibrio de los agentes vasoactivos como es descrito en la bibliografía del tema estudiado y por lo tanto se cuestiona la supuesta regulación de la circulación pulmonar basal del periodo perinatal.

## **ABSTRACT.**

### **A cGMP mediated pulmonary vascular reactivity study in hemin-treated newborn sheep.**

The pulmonary circulation's regulation in the perinatal period it is fundamental in the maintenance of mPAP and RVP decreased. A deregulation of basal pulmonary arterial tone can lead to pathologies as pulmonary hypertension. It is described that the basal pulmonary arterial tone regulation it is given by a balance between constrictors and dilators agents. The main signal transduction pathway involver according to research it is the sGC-cGMP-PKG one, sGC can be activated by gaseous compounds as NO (produced on the endothelial layer by eNOS) and in a minor degree by CO, which can be produced endogenously by hemoxygenases. The data showed that exogenous hemin administration in hypertensive newborn lamb can stimulate the sGC-cGMP pathway. It is unknown of the effects of the induction of cGMP-dependent response in a pulmonary normotensive newborn sheep model. Our hypothesis it's that hemin administration lead to an exacerbation of the cGMP pathway on the pulmonary circulation regulation. Normotensive newborn sheep were used from lowlands, dividing them on two random groups. Hemin (15mg/Kg weight) or control (Vehicle 0.01N NaOH and PBS 1x) was administered from the 5<sup>th</sup> day of life, for 10 days. On day 17 postnatal life the animal was euthanized and tissues were collected for the *ex vivo* study with wire myographies of functional study of the cGMP dependent pathway in small pulmonary arteries, and in vitro with PCR of the mRNA expression of the components of the pathway and ELISA technique for cGMP content of lung tissue.

The results showed an increase in the total cGMP content in hemin group administration and an increase in cGMP-dependent functionality hence accepting the hypothesis of this study. This results contrast with the in vivo response where mPAP was unmodified. It is concluded that the basal pulmonary circulation tone regulation is not dependent of the balance between the vasoactive agents as described by a lot of researchers of the studied topic and therefore, the supposed regulation of the basal pulmonary circulation of the perinatal period is questioned.

## **I INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Aspectos básicos de la circulación pulmonaria y su regulación.**

La principal función de la circulación pulmonar es el intercambio gaseoso o hematosis al nivel alveolar, por lo que es necesario que todo el gasto cardiaco pase por su circulación (1). La circulación pulmonar tiene prácticamente el mismo flujo sanguíneo que la circulación sistémica, pero con un régimen de presiones seis veces menor, debido a su baja resistencia vascular, característica que adquiere durante los primeros minutos de vida extrauterina en el periodo de transición neonatal (1,2).

La sangre que llega a los alvéolos, para participar en el intercambio gaseoso, proviene de la circulación pulmonar (1). Esta difiere de la circulación sistémica en múltiples características hemodinámicas y funcionales, como una presión arterial pulmonar media (mPAP) y resistencia vascular pulmonar (RVP) disminuidas(1). Sin embargo, no siempre el flujo sanguíneo pulmonar fue igual durante el desarrollo, durante la vida fetal, los pulmones no participan del intercambio gaseoso y se caracterizan por estar llenos de líquido, poseer una pared arterial engrosada y un tono vasoconstrictor elevado (3). La transición de la vida intrauterina a la extrauterina, está caracterizada por cambios fisiológicos hemodinámicos, iniciados por el aumento del oxígeno que empieza a ingresar a los pulmones, durante el trabajo de parto, y que induce la expresión de agentes vasodilatadores que dilatan el lumen arterial, e inhiben la proliferación de las células que componen las arterias pulmonares, además de inducir o estimular los procesos que a continuación enumeraremos; el inicio de la ventilación pulmonar, que con los movimientos respiratorios ayudan a evacuar el líquido que antes llenaba los alveolos, y la desaparición de la circulación placentaria (4). La eliminación y absorción del líquido pulmonar y la ventilación, son claves para el establecimiento de la capacidad residual funcional (3,5,6). Esto permite evitar el colapso alveolar, insuflando los alveolos con cada ventilación. Además es importante para el descenso de la RVP, aumentando 10 veces el flujo sanguíneo pulmonar (2,3,5,6). La regulación del flujo sanguíneo esta mediado por un número de factores, entre los que se incluyen el

*shear stress* del flujo sanguíneo y el equilibrio entre agentes vasoactivos como óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGIs), endotelina (ET-1) y factores activadores de plaquetas, entre otros (2,5–9).

Al momento del nacimiento, y durante la transición perinatal, este territorio sufre un cambio radical en sus propiedades (2,3). Diversos autores han estudiado esta transición (2,3,6,10–13). Desde un punto de vista estructural, se ha descrito que las células que componen la arteria pulmonar sufren modificaciones radicales, es así, que el endotelio sufre un aplanamiento de sus células, pasando de ser las células cúbicas observadas en el periodo fetal, a una monocapa aplanada que recubre el lumen arterial (11). Las células musculares también sufren cambios, principalmente una reducción en su número, de manera que el grosor neto de la pared arterial pulmonar de los recién nacidos, disminuye de manera rápida, es decir a 72 horas desde el momento del parto, ya ha sido completamente remodelada la arteria pulmonar (2,3,11).

El estudio de las propiedades vasoactivas también ha sido desarrollado extensamente por diversos autores (3,12,13). En todos ellos se describe un territorio que modifica la expresión y funcionalidad de los agentes vasoactivos, a medida que se establece la circulación pulmonar neonatal (3,9,12–14). Todos describen el territorio pulmonar fetal, como una vasculatura, con un predominio del tono vasoconstrictor (mediado por ET-1, 5HT, tromboxano (TX)) por sobre el vasodilatador (mediado por NO, PGI<sub>2</sub>, bradiquininas) (2,3,14–16). Este predominio se invierte después del nacimiento, pasando a un predominio vasodilatador, dada la gran caída de la RVP que se produce en las primeras horas de vida (3,5,12,17).

Es en los días posteriores al nacimiento, donde la circulación pulmonar neonatal define sus propiedades y funcionalidades, modificando la estructura arterial y el establecimiento de un tono vasoactivo (2,3,14,17). Esto permite soportar el paso del 100% del gasto cardiaco por sus arterias, y convertirse en una circulación que es exquisitamente regulada por las concentraciones de oxígeno (2,3,17,18).

Como se describió en trabajos de finales del siglo XIX la vasoconstricción pulmonar hipóxica se caracteriza por que a medida que disminuye la

biodisponibilidad de oxígeno, la circulación pulmonar se contrae, favoreciendo que zonas vasculares pobremente oxigenadas se contraigan, disminuyendo la perfusión (19). Aun es controversial cual sistema es el que predomina en este proceso, hay quienes se inclinan por que son canales de potasio dependientes de voltaje, los que le dan a la circulación pulmonar la capacidad de responder a niveles bajos de oxígeno (14,20,21). Otros plantean que serían los radicales libres los que regularían este proceso (14,20,21). Hay quienes le confieren la regulación a los receptores mecánicos que sensan los cambios en el flujo sanguíneo (2,14,20,21).

Durante este periodo, la expresión génica y proteica de los diferentes actores que participan en los procesos de regulación del tono vascular, se ven modificados (2,3). En las primeras semanas de vida, son días de adaptación a un nuevo medio, y a nuevas exigencias vasculares, por lo que es muy interesante estudiar este periodo (2,14). Muchos trabajos han destacado el rol de los agentes vasoactivos en la regulación del tono arterial pulmonar en distintas momentos de la vida del individuo, en todos ellos destacan el rol del control local y lo describen como un gran equilibrio de agentes vasoconstrictores y vasodilatadores, para mantener una resistencia vascular y una presión arterial pulmonar baja, que como mencionamos anteriormente, es cerca de 6 veces menor a la sistémica. Sin embargo, poco se ha profundizado en esta regulación durante el período postnatal, donde ocurren grandes cambios fisiológicos, o adaptaciones al medio extrauterino, en que tanto la estructura de la arteria pulmonar, como sus propiedades vasoactivas son drásticamente modificadas, lo que lleva a preguntarse, ¿es el equilibrio vasoactivo el gran responsable de mantener esta resistencia vascular baja?

Comencemos por definir las arterias pulmonares desde el punto de histología. Estas se dividen en 3 capas concéntricas, la túnica íntima es la capa más interna compuesta por una capa de células endoteliales, la túnica media la cual contiene células de músculo liso (SMC) y la túnica adventicia que es la capa más externa, rica en fibras de colágeno y fibras elásticas (11,22) (Figura 1).



**Figura 1.** Determinación de morfometría de arteria pulmonar. Corte histológico de parénquima pulmonar, con tinción de Van Gieson. Negro: Núcleos celulares; rojo: tejido elástico; café: capa muscular.

Como se mencionó anteriormente, la túnica interna compuesta por una capa única de células endoteliales forma la mono capa interna del vaso, cubriendo los componentes celulares del vaso y del tejido conectivo (11). Las células endoteliales interactúan íntimamente con los contenidos vasculares, incluyendo las células sanguíneas circulantes y el plasma, las que son sujetos a las fuerzas hemodinámicas en la superficie luminal vascular (23).

La señalización producida por las células endoteliales, en respuesta a los estímulos del flujo sanguíneo, resultan en respuestas a corto plazo que regulan el flujo sanguíneo (21). Esto ocurre mediante la expresión de nuevos genes o secreción de factores que actúan en el endotelio o las células musculares adyacentes (2,3,21). Estos factores regulan los cambios a largo plazo tales como los cambios de sobrevida, proliferación, diferenciación y adhesión, permitiendo el mantenimiento del endotelio y de las estructuras vasculares asociadas, cómo lo es la capa muscular lisa (14,21).

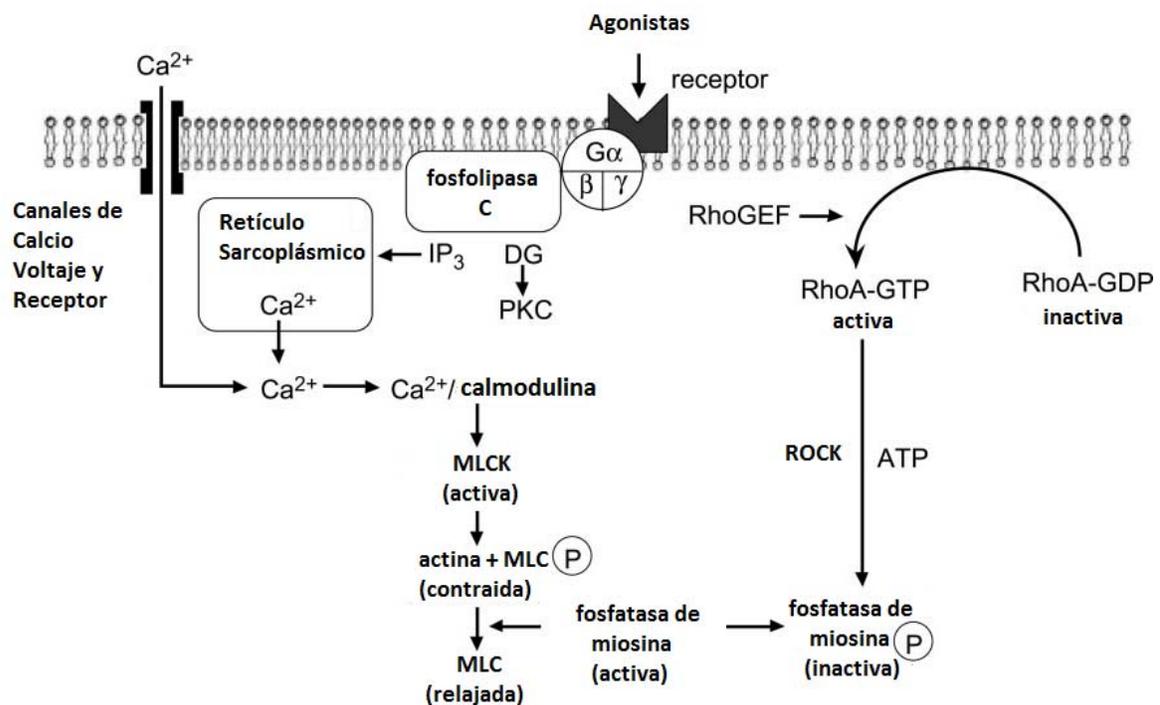
La túnica media, compuesta por las SMC, tiene el papel activo en el control del flujo sanguíneo (24). Mediante la interacción de los filamentos de actina y cadena liviana de la miosina, que permiten la contracción de las células musculares

,y por ende regular el diámetro luminal del vaso (24). Esta capa muscular, comparte características que son comunes a todos los músculos lisos: carecen del patrón de bandas estriadas cruzadas que se dan en músculo esquelético y cardíaco (de ahí el nombre “liso”), y su inervación esta mediada por el sistema nervioso autónomo lo que determina que su regulación no está dada por control voluntario (1).

La contracción del músculo liso, así como la del músculo esquelético, se produce por el cruce entre los filamentos de actina y miosina para generar fuerza, y los iones de calcio para controlar la unión del puente cruzado. Sin embargo, la organización de los filamentos contráctiles y el proceso de acoplamiento de la contracción de la excitación son bastante diferentes en estos dos tipos de músculo (1). Por eso los agentes vasoconstrictores, aumentan la sensibilidad a calcio de las proteínas que modifican el grado de entrecruzamiento de las fibras que participan de ella, o modifican el grado de fosforilación de las proteínas que modulan la vasocontracción (3,25).

### 1.1.1 Aspectos básicos de la vasoconstricción:

La contracción de los vasos sanguíneos consiste en una disminución del lumen (3,25). Esto ocurre mediante el acortamiento de las fibras de actina en las SMC de los vasos sanguíneos (1,25). Este proceso es regulado mediante la activación de receptores ubicados tanto en las células endoteliales como en las SMC, activadas ya sea por estímulos físicos, como el *shear stress*, o químicos como la 5HT y ET-1, y por estímulos de las células endoteliales o directamente por activación de los receptores de las SMC (3,14,21).



**Figura 2.** Esquema de contracción de las SMC.

DG: Diacilglicerol; IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato; PKC: Fosfoquinasa C; MLCK: Quinasa de la cadena liviana de la miosina; MLCP: Fosfatasa de la cadena liviana de la miosina; RhoGEF: dominio tipo Rho; RhoA: GTPasa pequeña homóloga ras miembro a; GTP: guanilil trifosfato; GDP: Guanilil difosfato; ROCK: Quinasa dependiente de la proteína tipo rho a; ATP: Adenosin trifosfato. Adaptado (25).

Los receptores de las células musculares se encuentran unidos a proteína G tipo  $\alpha$  y se encuentran anexos a fosfolipasa C (PLC) o a un homólogo de la familia génica Ras, miembro A (RhoA) dependiendo del agonista a unir. En el caso de la endotelina (ET-1), los receptores son ETA y ETB y están ligados a una PLC

(17,26). Los receptores de serotonina (5HT) 5HT1B/D, 5HT2A y 5HT2B que están ligados a una PLC o a una proteína RhoA (17,25–27).

ET-1, un polipéptido de 21 aminoácidos producido principalmente por las células endoteliales (1,26). Es un potente vasoconstrictor que presenta propiedades mitogénicas e hipertróficas (3,26). Estimula la proliferación, migración, contracción, remodelamiento de la matrix extracelular, secreción de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios en las SMC (9,28). Ejerce su efecto de una manera autocrina y paracrina a través de la activación de sus dos subtipos de receptores, tanto ETA como ETB (9,28). Ambos receptores pertenecen a la gran familia de receptores de transmembrana acoplados a proteínas G (9,28). Cada uno de los receptores está acoplado a un tipo distinto de proteína G, pero en ambos receptores la acción es aumentar el calcio intracelular (2,9). Los receptores ETA están altamente expresados en las células musculares de los vasos, mientras que ETB se encuentra predominantemente expresados en las células endoteliales (29–31). Ambos receptores exhiben roles fisiológicos relativamente distintos (31,32). La activación de ETA por ET-1 contribuye a la vasoconstricción, pues aumenta el calcio intracelular de las células musculares induciendo la unión entre miosina y actina, y el crecimiento celular y adhesión celular, mientras que la unión de ET-1 a ETB lleva a una vasodilatación, pues en células endoteliales el aumento de calcio aumenta la unión calcio-calmodulina, que activa la eNOS e induce la liberación de NO y prostaciclina (9,28). A nivel fetal, la expresión de ET-1 se encuentra elevada desde mediados de la gestación hasta el momento del parto, donde tiene como función aumentar la vasodilatación pulmonar inducida por ventilación y oxigenación en una vía principalmente dependiente de la activación de ETB (28,32). En el periodo de transición ET-1 reduce su expresión contribuyendo a la mantención de la baja PVR en el RN (9,28–31).

Por otra parte, la 5-HT actúa como un mediador bioquímico y sus funciones incluyen un rol en la neurotransmisión del sistema nervioso central, hemostasia, espasmos vasculares y motilidad gastrointestinal (33). 5HT tiene un importante papel en el periodo fetal en la mantención de la RVP elevada (34). Los niveles de 5HT disminuyen luego del parto (34,35). Una mantención de los niveles elevados

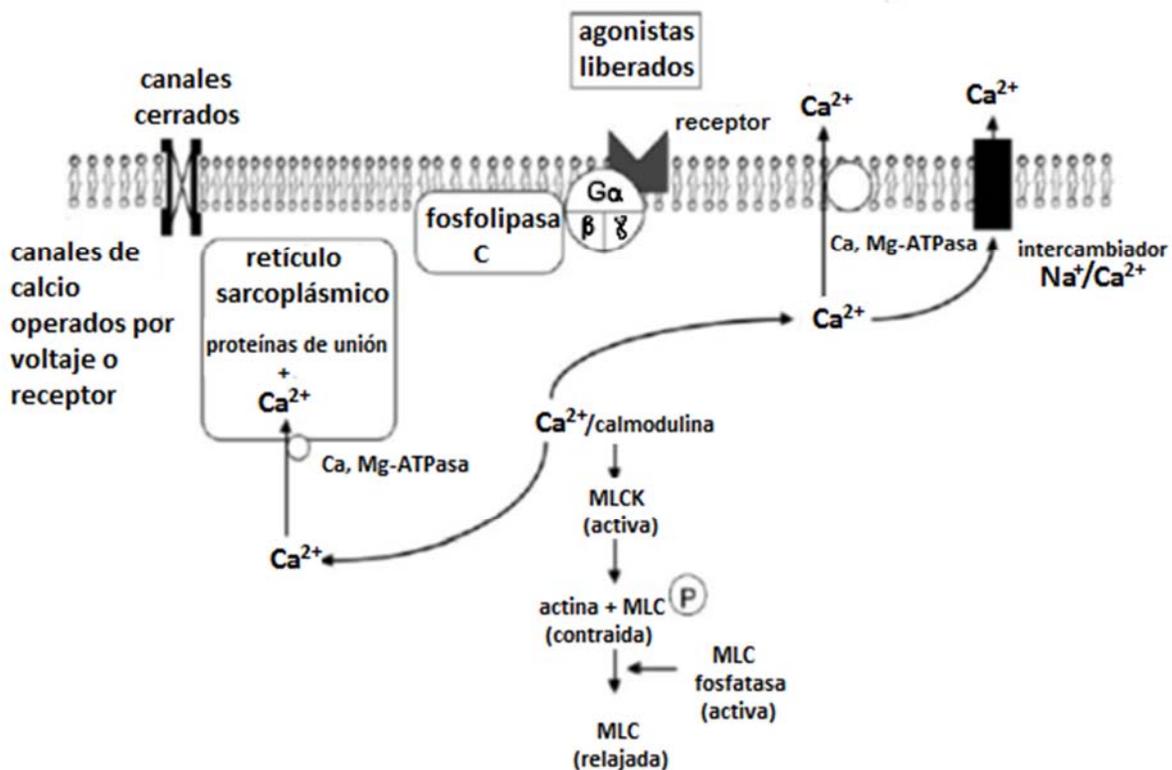
de 5HT se asocian al desarrollo de hipertensión pulmonar del RN (34–36). La respuesta celular de 5HT es a través del aumento de la actividad de la PLC acoplada a proteína Gq, donde produce dos segundos mensajeros potentes a partir del lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5- difosfato: diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5 - trifosfato (IP<sub>3</sub>) (1,25). IP<sub>3</sub> se une a receptores específicos del retículo endoplásmico, produciendo la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>), aumentando la concentración del calcio citosólico ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Este [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> junto a DG activan a la proteína quinasa C (PKC), que fosforila proteínas específicas (1,25,37).

En las SMC PKC tiene efectos promotores de contracción al fosforilar canales de Ca<sup>2+</sup> u otras proteínas que regulan la contracción (1,25). El [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se une a la calmodulina en el citosol, este complejo se une a la quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK) que utiliza adenosina trifosfato (ATP) para fosforilar la miosina (1,25,37). La miosina fosforilada se une a los filamentos de actina produciendo el puente cruzado y la contracción del músculo (1,25,37) (Figura 2).

En el caso de la respuesta a tromboxano (TBx) a través de los receptores de TBx, estos se encuentran unidos a una molécula de RhoA que activa la rho quinasa (ROCK-2), que a su vez activa la MLCK (38,39). El TBx A2 (TxA2) es un prostanoide inestable, metabolito del ácido araquidónico (AA), producido predominantemente en plaquetas, en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos (40). Puede ser producido en el endotelio por acción de la TBx sintasa (TXS) utilizando prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) como sustrato y activa los receptores de TXA2 en la membrana de las SCM (41). PGI<sub>2</sub> por su parte, tiene propiedades dilatadoras y tiene un rol importante en la disminución de la RVP en el nacimiento (3,42,43). Un desbalance entre los niveles de PGI<sub>2</sub> y TXA2, con un aumento de la producción de TXA2, favorece efectos vasoconstrictores (42,43). Este balance entre PGI<sub>2</sub> y TXA2 es modulado por oxígeno y es dependiente de la edad (42,43). Un aumento de la producción de TXA2 no inicia el fenotipo de la hipoxia persistente en RN pero activa salidas del ciclo celular y adherencia al fenotipo contráctil (42,43).

### 1.1.2. Aspectos básicos de la vasorelajación:

La relajación del músculo liso ocurre ya sea como resultados de la remoción del estímulo contráctil o por directa acción de una molécula que inhiba el mecanismo contráctil (25). Sin importar cual, el proceso de relajación requiere de una disminución del  $[Ca^{2+}]_i$ , y un aumento en la actividad de la MLCP (1,25). El retículo endoplásmico y la membrana plasmática contienen Ca-Mg-ATPasas las que remueven el  $Ca^{2+}$  del citosol (1,25). En la membrana plasmática, se encuentran también intercambiadores  $Na^+/Ca^{2+}$  que ayudan a la disminución del  $[Ca^{2+}]_i$ . Durante la relajación, los canales de  $Ca^{2+}$  (tanto de receptor o de voltaje) en la membrana plasmática se cierran, resultando en una disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula (1,25) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de relajación de las SMC.

MLCK: Quinasa de la cadena liviana de la miosina; MLCP: Fosfatasa de la cadena liviana de la miosina. Adaptado (25)

Dentro de los vasorelajantes más importantes se encuentran el óxido nítrico (NO), que es un gasotransmisor producido endógenamente por la enzima NO sintasa (NOS) (3,44–46). Se sintetiza a partir de L-arginina (L-Arg), NO y L-citrulina (46). En el endotelio vascular, la Arginasa-2 (Arg-2), compite con la NOS por la L-Arginina, y un desbalance del equilibrio, es señal de disfunción endotelial (47). Se conocen 3 isoformas de NOS, inducible (iNOS), endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) (48). De estas, eNOS es el regulador más importante en la producción de NO en la circulación pulmonar perinatal (49).

La NOS produce NO catalizando una oxidación de 5 electrones de un nitrógeno guanidino de la L-Arg. La oxidación de L-Arg a L-citrulina ocurre vía dos reacciones de mono-oxigenaciones sucesivas produciendo N<sup>ω</sup>-hidroxil-L-arginina (NOHLA) como un intermediario (48). El segundo paso requiere un solo electrón, pero involucra la activación de una molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>), gracias a la presencia de tetrahidrobiopterina (H<sub>4</sub>B) mediante un enlace peróxido al complejo hemo, terminando en la liberación del NO del complejo férrico mediante la reducción del H<sub>4</sub>B (48).

El NO generado difunde a la SCM, que está próxima a la célula endotelial (3,50,51). Se estimula la guanilato ciclasa soluble (sGC) que cataliza la producción de guanilil monofosfato cíclico (cGMP), el segundo mensajero predominante en la vía vasodilatadora (50,51).

## **1.2. Activación de sGC y producción de cGMP.**

La generación de cGMP es mediada por las isoformas de la enzima sGC y guanilato ciclasa particulada (pGC) (52,53). Ambas isoformas de GC difieren en las moléculas que las activan (52,53). La pGC es estimulada por péptido natriuréticos (53). La sGC es activada por NO y CO, generados en la célula endotelial y que difunde a la célula muscular lisa, donde se encuentra ubicada la sGC (54–56).

La sGC, isoforma predominante en los procesos de control del tono vascular, es una hemoproteína citosólica y heterodimérica con dos subunidades homólogas  $\alpha$  (73 a 82 kDa) y  $\beta$  (~ 70 kDa) con un grupo prostético hemo en la subunidad  $\beta$

(52,56,57). Es estimulada por NO y monóxido de carbono (CO) mediante la unión al Fe<sup>2+</sup> del grupo hemo, que lleva a un corte del enlace entre la Histidina (His<sup>105</sup>) y el Fe<sup>2+</sup>, llevando a un cambio conformacional que es propagada a la subunidad catalítica ( $\alpha$ ), donde aumenta la producción de cGMP (52,56,57).

La sGC puede existir en dos formas distintas: la forma nativa, contenedora del grupo hemo o reducida, que es la forma receptora endógena de NO y la forma oxidada o que pierde el grupo hemo, involucrada en el desarrollo de variadas enfermedades cardiovasculares (52,58). La forma libre del grupo hemo ya no es sensible al NO y se denomina como disfuncional (58). La sGC libre de grupo hemo es rápidamente degradada por ubiquitinización (59). Los estimuladores de sGC, dependientes de hemo tienen un modo dual de acción al sinergizar con el NO endógeno y de estimular directamente la forma nativa de la enzima independiente de NO (52,60). Los activadores de sGC hemo independientes, por el contrario son capaces de activar la sGC patológicamente libre del grupo hemo, cuando está en una condición en la cual el NO del organismo prácticamente no tiene efecto (59–61). sGC aumenta su expresión y actividad con la edad durante el periodo de transición neonatal (62).

El cGMP producido, activa variados sistemas efectores, tales como la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG-1) (3,52). Esta quinasa fosforila distintas proteínas que regulan de manera negativa la contracción mediada por la ROCK-2 (50). El regulador por excelencia de los niveles de cGMP en la célula es la fosfodiesterasa 5 (PDE-5), que es cGMP específica y tiene como acción principal, la degradación del cGMP mediante la ruptura del ciclo a través de una reacción de hidratación, generando GMP (63–65). La expresión, pero no la actividad de PDE-5, es dependiente de la edad, teniendo en las primeras semanas de vida un aumento a la activación en respuesta a la activación de sGC por efecto de CO (63).

ROCK-2 por su parte tiene un papel importante en la mediación de la vasoconstricción y el remodelado vascular en la patogénesis de la hipertensión pulmonar (9,16,66,67). ROCK induce la vasoconstricción mediante la fosforilación de la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MLCP), por lo tanto, disminuye

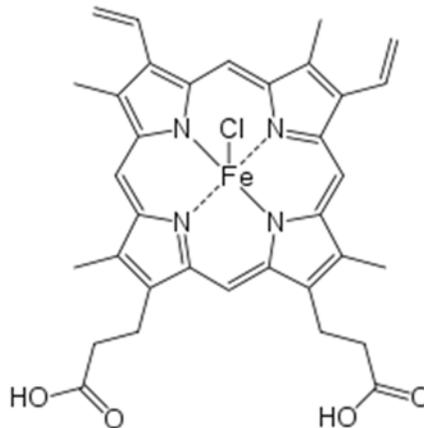
la actividad de la fosfatasa y aumenta la contracción del músculo liso vascular (3,66). Los niveles de ROCK-2 se encuentran elevados en el feto y son responsables de la RVP aumentada (14,16). Desde el nacimiento y hasta las dos semanas se produce una disminución de la actividad de ROCK-2, que en caso de ser revertida, es parte del mecanismo de la HPPN (2,68,69)

Otra molécula que activa la sGC, es el monóxido de carbono (CO), sintetizado por la hemoxigenasa (HO) (70,71). La HO es una enzima microsomal con tres isoformas diferentes, HO-1 es una proteína de 32 kDa inducida frente a estímulos tales como rayos ultra violeta, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hipoxia, pro oxidantes, inflamación, metales pesados y NO (72). Por otro lado, la HO-2 es una proteína de 36 kDa y se expresa normalmente en las capas endoteliales y musculares de los vasos sanguíneos y generan CO que modulando, bajo condiciones fisiológicas, el tono vascular (73,74). HO-3 tiene un peso molecular de 33 kDa y comparte una considerable homología con HO-2 (73,74). Por otra parte, existe una regulación de HO-1 frente a estímulos (74,75), Se ha visto un aumento de su expresión en aterogénesis, heridas por reperfusión de isquemia y anafilaxis cardiaca, así también por hipoxia (73–75).

### **1.2.1. Hemina como inductor de la hemoxigenasa y de su vía de señalización.**

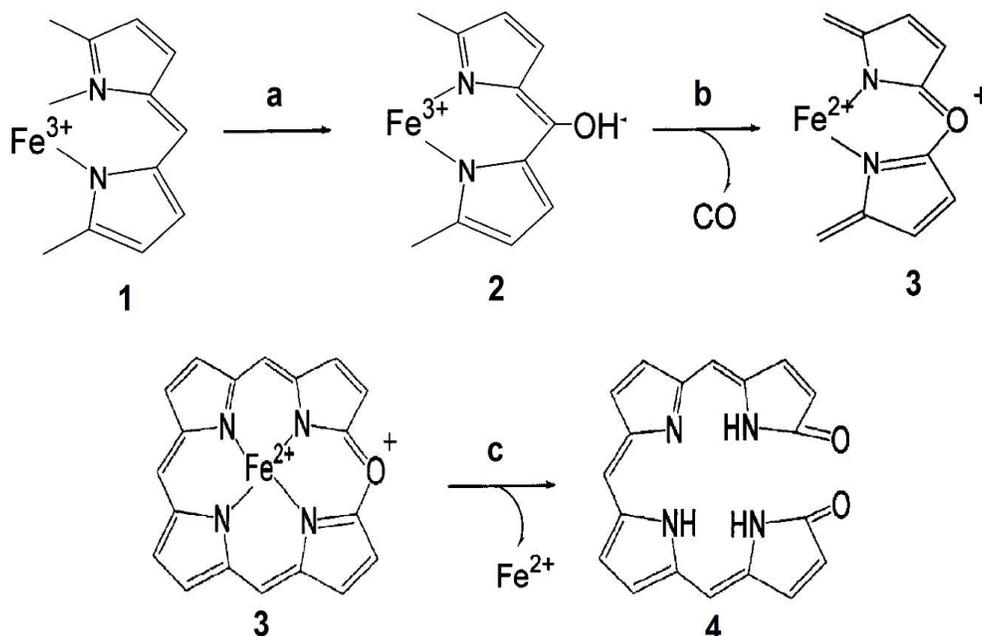
La hemina es un inductor de la HO, derivado de la hemoglobina, que fue aprobado por la FDA como tratamiento de la porfiria (76). La hemina es producida de manera endógena en el cuerpo humano, como por ejemplo en el recambio de eritrocitos (76,77). El grupo hemo es un grupo prostético, compuesto de un Fe<sup>2+</sup> coordinado a un tetrapirrol, sistema heterocíclico conocido como protoporfirina a través de sus 4 átomos de nitrógeno (77,78). Los 4 pirroles se encuentran unidos por enlace metino, el Fe<sup>2+</sup> está unido a un residuo de histidina de la cadena globular y a un oxígeno que une de manera coordinada (77,78). El Fe<sup>+2</sup> del grupo hemo en la hemoglobina se encuentra en ese estado de oxidación, para permitir la unión reversible a oxígeno (78). En casos donde la oxidación de la hemoglobina ocurre y produce la metahemoglobina, se oxida el Fe<sup>+2</sup> a su forma férrica (Fe<sup>3+</sup>) haciendo

que la hemoglobina sea incapaz de transportar oxígeno (77,78). La liberación del grupo hemo desde la globina, lleva a la oxidación del hierro y a la generación, en presencia de ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) a hemina, la forma oxidada de la protoporfirina IX (Figura 4) (77,78).



**Figura 4.** Estructura de hemina.

Hemina actúa como sustrato de HO, donde se convierte en 3 grandes etapas, a biliverdina, con liberación de CO y  $\text{Fe}^{2+}$ . La primera etapa corresponde a la conversión de hemina a  $\alpha$ -meso-hidroxihemo (Figura 5, compuesto 2), donde mediante el uso de un  $e^-$ , una molécula de  $\text{O}_2$  y un  $\text{H}^+$  llevan a adicionar un grupo OH en el carbono alfa del grupo porfírico con la liberación de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . La siguiente etapa, corresponde a la conversión de  $\alpha$ -meso-hidroxihemo a verdohemo (Figura 5, compuesto 3) donde, mediante el uso de una molécula de  $\text{O}_2$ , un  $e^-$  y un  $\text{H}^+$ , se produce la reducción del grupo porfírico, específicamente del Fe del ciclo y el OH agregados previamente (79). Es en esta etapa donde se produce la liberación de una molécula de CO (79). La última etapa de la degradación de hemina por HO se trata de la conversión de verdohemo a biliverdina (Figura 5, compuesto 4), donde se utilizan 3  $e^-$ , 3  $\text{H}^+$  y un  $\text{O}_2$  se abre el ciclo, y se libera el  $\text{Fe}^{2+}$  del grupo hemo y una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (79,80).

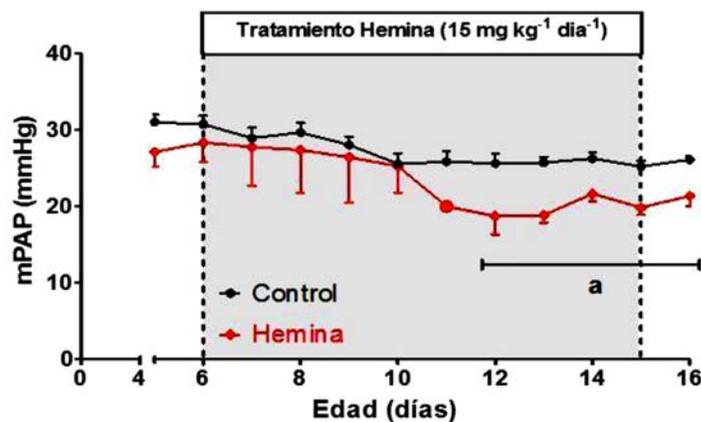


**Figura 5.** Mecanismo de conversión de hemina a biliverdina por hemoxigenasa-1. Modificado de (79). 1: hemo; a: etapa de adición de grupo OH a carbono alfa del grupo hemo; 2: α-meso-hidroxihemo; b: etapa de reducción de Fe y OH; 3: verdohemo; c: etapa de deshidratación final; 4: biliverdina.

La administración de hemina induce en ratas y ovejas hipertensas vasodilatación y disminución de la presión arterial sistémica (73,81). El grupo de Ndisang demostró que en ratas de 4 y 8 semanas de vida, la administración de hemina aumenta los niveles proteicos de sGC y el contenido de cGMP en distintos lechos vasculares, tales como el lecho pulmonar y aórtico (73,82). Además, la administración de hemina en corderos recién nacidos sometidos a hipoxia crónica gestacional (81), induce una disminución de la mPAP, índice de hipertrofia cardíaca derecha y el grosor de las arterias pulmonares principales como pequeñas (81,83). Desde un punto de vista funcional y de expresión, la hemina exagera la vía vasodilatadora dependiente de cGMP, aumentando la expresión proteica de ambas isoformas de HO, y también de sGC en animales de tierras altas (TA) o hipertensas (84). Este efecto podría provocar un aumento en la producción de cGMP (84). Junto con aumentar la relajación dependiente de NO (81). La hemina también potencia la relajación dependiente de endotelio y posee propiedades antioxidantes en modelo de rata hipertensiva adultas (85).

En el recién nacido de oveja (RNOV) de TA la producción de CO y de HO-1 se encuentran marcadamente reducidas en comparación al modelo de llama (84). La llama es un modelo adaptado a la altura donde se ha estudiado que esta adaptación podría ser explicado por un aumento del sistema HO-CO-cGMP (84). El aumento relativo del sistema NO pulmonar observado en ovejas, parece ser insuficiente para detener el aumento de la mPAP en ovejas de TA (71,84,86).

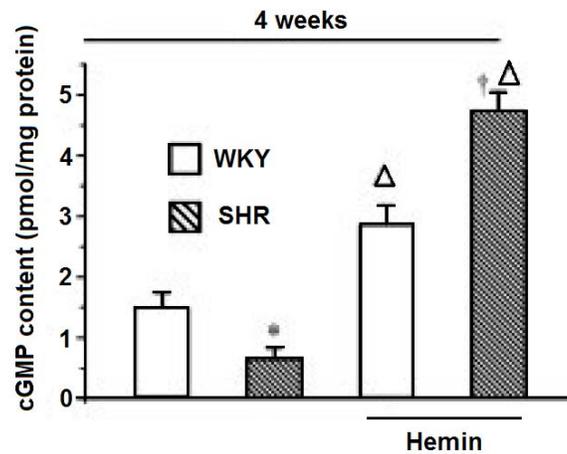
Existe un antecedente que en recién nacidos de oveja de TA, la administración de hemina, activa el sistema HO, disminuyendo la presión pulmonar media la cual se mantiene aún terminado el tratamiento de 10 días (Figura 6) (81).



**Figura 6.** Efectos de hemina en la hipertensión pulmonar de los RNOV de TA. En negro se observa el grupo control y en rojo el grupo hemina.  $p < 0,05$  ANOVA una vía, post hoc test Dunnett: a vs control. Modificado de (81).

Si bien existen estudios del efecto de la hemina en ovejas recién nacidas hipertensas, no existe conocimiento de cuáles son los efectos de la administración de hemina en RNOV que son normotensos, y por lo tanto en la vía dependiente de cGMP. Como antecedente, se puede mencionar el trabajo donde se estudió el efecto de la inducción de la vía HO comparando animales normotensos con y sin tratamiento de hemina, en conjunto con animales hipertensos con y sin administración (82). Se observó que hemina, produce los efectos vasodilatadores previamente mencionados, junto con una diferencia en los niveles de sGC en los animales normotensos (82). Se determinó un aumento en los niveles de la enzima

y del contenido de cGMP al inducirse la vía HO, pero al ser ratones de 4 semanas no se puede ajustar al grupo objetivo de interés (Figura 7) (82). Queda entonces la incógnita de cuál es el efecto en la vía vasodilatadora de cGMP al administrar hemina en un modelo de recién nacidos sanos y si se observará una respuesta similar al de los modelos de TA. También, se abre a discusión el hecho, que alteraríamos el equilibrio vasoactivo que mantiene la resistencia vascular pulmonar, según lo descrito en bibliografía, por lo que se podría esperar, de aprobarse nuestra hipótesis, una disminución de la resistencia vascular y, por ende, una disminución de la presión arterial pulmonar.



**Figura 7.** Efectos de hemina en los niveles de cGMP de aortas de ratones hipertensos y WKY. WKY: ratones control; SHR: Ratones hipertensos. Los cambios en los contenidos de cGMP en aortas de ratones de 4 semanas,  $\Delta$   $p < 0,05$  versus no tratado mismo grupo. Adaptado de (82).

## **II HIPÓTESIS.**

La administración de hemina produce en la circulación pulmonar neonatal una exacerbación de la vía vasodilatadora dependiente de cGMP.

### **2.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el efecto de la administración de hemina sobre la vía vasodilatadora dependiente de cGMP.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Determinar si la vasodilatación de las arterias pulmonares pequeñas en ovejas recién nacidas inducida por cGMP es exacerbada por hemina.
- Investigar el mecanismo por el cual hemina exagera la vasodilatación inducida por cGMP en las arterias pulmonares pequeñas en ovejas recién nacidas.

### III METODOLOGÍA.

#### 3.1. Descripción modelo animal.

Se utilizó como modelo experimental el recién nacido ovino (RNOV), concebidos, gestados y nacidos en el valle de Lluta en la Región de Arica y Parinacota. Al comienzo del tratamiento presentaban un peso de  $2,5 \pm 0,2$  Kg para el grupo control y  $3,7 \pm 0,3$  Kg grupo hemina, con una mPAP de  $12,15 \pm 5,73$  mmHg versus  $16,40 \pm 2,49$  mmHg para el grupo control y el grupo hemina respectivamente.

Se estudiaron doce RNOV seleccionados a los dos días de vida y se mantuvieron con alimentación a libre demanda junto a su madre durante todo el periodo de estudio. Se dividieron de manera aleatoria en dos grupos: grupo control (n=6; vehículo, NaOH 0,01 N y PBS 0,9 X) y grupo hemina (n=6;  $15 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  en NaOH 0,01N y PBS 1x). Al quinto día de vida se comenzó el tratamiento con hemina o vehículo por vía subcutánea hasta completar diez días de tratamiento. Al día 17 de vida, se eutanaciaron con una sobredosis de tiopental sódico ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Posteriormente se realizó la obtención de tejido, el que se utilizó para los estudios *ex vivo* (miografías) e *in vitro* (biología molecular).

Por razones de bioética, regido bajo el principio de las tres Rs (87), se utilizó el menor número de animales posible para lograr un resultado estadísticamente significativo. Todos los procedimientos y experimentos con animales realizados en esta tesis se encuentran dentro del marco del proyecto Fondecyt N° 1130424 y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, CBA#0561 FMUCH.

#### 3.2. Protocolo experimental farmacológico y recolección de tejido.

La preparación de la solución de hemina se realizó en condiciones de protección a la luz directa, pues es fotosensible. Con estas consideraciones, se comenzó masando la cantidad necesaria de acuerdo al peso de las ovejas ( $15 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) y protegiéndola en un tubo eppendorf ámbar. Se procedió a solubilizarla en NaOH 0,1 N; mezcla que se sometió a 2 turnos de 4 minutos en un sonicador, de manera de mezclar y solubilizar la hemina. Posteriormente se diluyó con PBS 1X para neutralizar el NaOH, y alcanzar una concentración final de NaOH 0,01 N,

en una jeringa protegida de la luz. El contenido se esterilizó , mediante un filtro de 22  $\mu\text{m}$ , previamente a ser inyectada de manera subcutánea en la parte posterior de la espalda de los neonatos ovinos. (73,81).

Como se mencionó anteriormente, al día 17 de vida los animales se eutanaciaron con tiopental sódico ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) donde se recolectaron los órganos y tejidos para su posterior procesamiento o estudio. El pulmón derecho se utilizó para extraer las pequeñas arterias que se utilizaron en miografía y el pulmón izquierdo fué perfundido con suero fisiológico y fragmentado para ser almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3. Determinación de las concentraciones de cGMP en tejido pulmonar.**

#### **3.3.1. Determinación de la concentración de proteínas totales.**

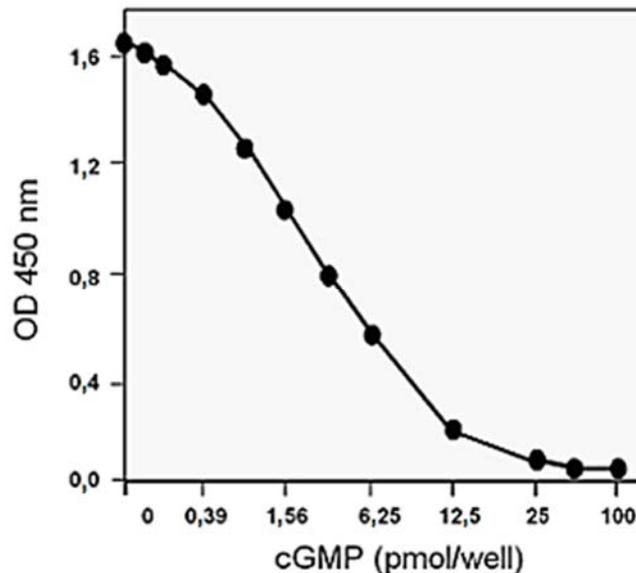
Para normalizar la determinación por concentración de proteínas se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Según sugiere el fabricante, brevemente, utilizamos aproximadamente 200 mg de tejido, agregando 1,2 mL de buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), se homogenizó la muestra, cuidando que no hubiese un aumento de la temperatura, y se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos a  $12.000 \text{ xg}$ , se extrajo el sobrenadante. Se realizó la curva estándar de albumina ( $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se midió en duplicado la muestra a  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  en el lector de placa marca BIOTEK ExL800.

#### **3.3.2. Determinación del cGMP en tejido pulmonar.**

La determinación del contenido de cGMP se realizó utilizando la técnica de ELISA. ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detectó mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable colorimétricamente. En este estudio en particular se utilizó la técnica de ELISA “Sándwich”, desarrollada por Berson y cols (88) y perfeccionada por Weemen y Schuurs (89). Es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se aplicó la muestra problema en la que se encuentra el

antígeno, que fue retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que eliminó el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (88,89). Para la prueba de cGMP se utilizó el Kit ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de cGMP de Biovision (N° Cat: K372) y se realizó el siguiente protocolo.

Se preparó la muestra para la prueba de cGMP, de acuerdo a instrucciones del fabricante del Kit. Se masaron alrededor de 100 mg de tejido de pulmón y se añadió 1 mL de HCL 0,1 M, para preservar el cGMP obtenido. Se homogenizó en frío y se centrifugó a 16000 xg por 5 minutos para luego recuperar el sobrenadante. Para la curva estándar de cGMP se utiliza diluciones de un stock estandar de cGMP de pmol/ $\mu$ L, en un rango que va desde 0 hasta 100 pmol/pocillo.



**Figura 8.** Curva estándar de cGMP con el protocolo ELISA. Biovision.

A 100  $\mu$ L de muestra se le agregó 50  $\mu$ L de buffer neutralizante del kit y 5  $\mu$ L de mezcla acetilante, se agitó mediante Vortex y se incubó por 10 minutos a

temperatura, para finalmente agregar 845  $\mu\text{L}$  del buffer de ensayo. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del ensayo para agregar al pocillo, en duplicado.

Se añadió 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-cGMP a todas las muestras con excepto del blanco y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se añadió 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti anti-cGMP y se dejó incubando por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó 5 veces con el buffer 1X y se vaciaron completamente los pocillos. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  del revelador y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave para luego detener la reacción utilizando 100  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M por pocillo donde se observa un cambio de color de azul a amarillo. Se realiza la lectura a  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  y se les resta el valor de ruido a todas las muestras y el estándar y se genera un gráfico de la curva estándar utilizando la porción lineal.

#### **3.4. Mediciones *ex vivo*. Miografía de arterias pequeñas de resistencia pulmonar.**

Los pulmones se removieron e inmediatamente inmersos en solución Krebs fría (Tabla 1). Luego se disecó el árbol arterial del pulmón derecho (tercio medio) extrayendo arterias pulmonares pequeñas de quinta o sexta rama (diámetro interno de aproximadamente 150-400  $\mu\text{m}$ ) bajo una lupa (Nikon 102, 4X). Las arterias de diámetros internos entre 150-400  $\mu\text{m}$  se cortaron en segmentos de cerca de 2 mm de longitud.

Los anillos arteriales se montaron en un miógrafo (Wire Myograph 610M, Danish Myo Technologies, Aarhus, Dinamarca), fijados a un transductor de fuerza isométrico (KistlerMorce DSC 6, Seattle, WA), por dos alambres de tungsteno inoxidable (diámetro 40  $\mu\text{m}$ ). El alambre fue asegurado al transductor de fuerza y al posicionador micrométrico. El anillo arterial se mantiene en un baño de solución Krebs a 37°C burbujeadado con una mezcla gaseosa de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ .

Se procedió a determinar el diámetro óptimo, el cual equivale a la tensión que ejerce el volumen de sangre sobre la pared arterial, denominada presión fisiológica transmural (90). A cada anillo arterial se le fue aumentando la separación de los alambres, hasta que se alcanzó una tensión equivalente a la tensión ejercida en la

arteria normalmente, que es de una presión media alrededor de 12 mmHg y una sistólica alrededor de 20 mmHg, por lo tanto no debe sobrepasar una tensión equivalente a 2,5 mN. Este diámetro, es el mismo donde se observó su mayor respuesta contráctil a 125 mM K<sup>+</sup>, usando un protocolo de diámetro-tensión (91). Esto se hizo para simular condiciones *in vivo* por dos razones principales; primero, porque la respuesta vascular estimulada depende del grado de estiramiento; y en segundo lugar, porque este grado de estiramiento da la máxima respuesta vascular (92).

Para probar la reactividad vascular contráctil máxima, se generó una curva concentración-respuesta (CCR) de potasio (K<sup>+</sup>) después de un período de equilibrio de 20 minutos sometiendo a los vasos a dosis crecientes de una solución de Krebs-K<sup>+</sup> (6,25 mM a 100 mM) (Tabla 1), lavando con solución Krebs dos veces entre dosis. Se realizaron incubaciones con soluciones de concentración creciente de KCl, combinando fracciones de solución de Krebs-Na<sup>+</sup> y Krebs-K<sup>+</sup> para determinar la capacidad contráctil de las arterias y caracterizar la contractilidad en función de la respuesta a concentraciones crecientes de potasio (93).

Para estudiar la función vasoconstrictora de las arterias pulmonares, se realizaron CCR a endotelina-1 (ET-1, Tocris N° cat: 1160, agente vasoconstrictor endógeno, 10<sup>-13</sup>M – 10<sup>-6</sup>M); 5-hidroxitriptamina (5HT, Sigma N° cat: H9523, Serotonina, 10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-4</sup>M) y 9,11-dideoxi-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -metano epoxi PGF2 $\alpha$  (U46619, Cayman Chemicals N° Cat: 16450, análogo de tromboxano A2, 10<sup>-13</sup>M – 10<sup>-5</sup>M), en condiciones iniciales de tensión basal del anillo arterial.

**Tabla 1.** Composición solución Krebs y Krebs-K<sup>+</sup>.

	<b>Krebs (mmol/L)</b>	<b>Krebs-K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>
NaCl	118,5	-----
NaHCO <sub>3</sub>	25,2	25,2
KCl	4,74	124
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	1,2
MgSO <sub>4</sub>	1,2	1,2
Glucosa	5,0	5,0
CaCl <sub>2</sub>	2,5	2,5

Para estudiar la función vasorelajante endotelial, se realizó una precontricción con 5HT 10<sup>-6</sup>M. Consiste en incubar el anillo arterial en condiciones de tensión basal, con la concentración de vasoconstrictor escogido, y se realizaron CCR a 2-acetiloxipropil-trimetil-azanio (metacolina, Sigma N° Cat: 1396364, estimulador vasodilatación endotelial, 10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-3</sup>M) con bloqueadores farmacológicos N<sup>5</sup>-[imino(nitroamino)metil]-L-ornitina, metil ester, monohidrocloruro (L-Name, Sigma N° Cat:N5751, inhibidor eNOS, 10<sup>-5</sup>M), indometacina (inhibidor COX 1 y 2, Sigma N° Cat: I7378, 10<sup>-5</sup>M) y S-(2-boronoetil)-L-cisteina ( BEC, Calbiochem N° Cat: 197900, inhibidor arginasa, 10<sup>-5</sup>M).

Para estudiar la función vasorelajante muscular, se realizó una precontricción con 5HT 10<sup>-6</sup>M y se realizaron CCR a nitroprusiato de Sodio (SNP, Sigma N° Cat: S0501, dador de NO, 10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-3</sup>M) y 3-(5'-Hidroximetil-2'-furil)-1-benzil indazola (YC-1, Caycam Chemicals N° Cat: 81560, activador sGC, 10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-4</sup>M).

Para estudiar la función vasorelajante muscular dependiente de cGMP y la regulación del cGMP en las arterias, se realizó una precontricción con 5HT 10<sup>-6</sup>M y se realizaron CCR a 5-{2-Ethoxi-5-[(4-metilpiperazin-1-il)sulfonil]fenil}-1-metil-3-propil-1H,6H,7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (sildenafil, Tocris N° Cat: 3784, inhibidor de PDE-5, 10<sup>-12</sup>M – 10<sup>-5</sup>M), 8-bromoguanosina 3',5'-ciclico monofosfato (8Br-cGMP, Tocris N° Cat: 1089, activador proteína PKG-1, 10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-4</sup>M) y 5-

(1,4-diazepano-1-sulfonil)isoquinolina (fasudil, Tocris N° Cat: 541, inhibidor ROK,  $10^{-10}\text{M} - 10^{-4}\text{M}$ ).

Las curvas de dosis respuesta se analizaron en términos de potencia ( $pD_2$ , donde  $pD_2 = -\log [EC_{50}]$ ) y corresponde a una expresión de la actividad de un fármaco, en términos de la concentración o cantidad necesaria para producir un efecto definido (94) y respuesta máxima ( $R_{max}$ ). Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación sigmoideal, en el caso de las dosis expresadas en función de  $\log [M]$ , o de Boltzman, en el caso de las dosis expresadas en mM, que es el caso de la curva de KCl (Prisma5, GraphPad, USA). Las respuestas a sustancias vasorelajantes se expresaron como porcentaje de la reducción a una contracción inducida por una dosis sub-máxima a  $K^+$ .

### **3.5. Determinaciones *in vitro*. Análisis de los niveles de expresión de mRNA por PCR.**

Para la determinación *in vitro* se utilizó el tejido pulmonar recolectado y almacenado a  $-80^\circ\text{C}$ . Para la preparación de RNA total se utilizó una modificación de la técnica descrita anteriormente (95). Se pesaron y procesaron tejidos de hasta 200 mg, al que se le agregaron 1,0 mL de TRIzol<sup>MR</sup> (N°cat: 15596, Invitrogen, USA) a  $4^\circ\text{C}$  por cada 100 mg de tejido masado. A continuación, se homogenizó la muestra con un homogenizador (Omni Th-115), se dividió el contenido en duplicados y se añadió a cada uno 0,2 mL de cloroformo a  $4^\circ\text{C}$  por cada mL de TRIzol<sup>MR</sup> agregado inicialmente.

Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000  $xg$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para la separación de fase orgánica. Luego, la fase líquida se extrajo de cada tubo y se le añadió 0,3 mL de alcohol isopropílico frío por cada mL de TRIzol<sup>MR</sup> agregado, precipitando las muestras a  $-20^\circ\text{C}$  por lo menos 1 hora. Posteriormente, se continuó el protocolo de extracción utilizando columnas de extracción del kit SV Total RNA Isolation System (Promega, N° Cat: Z3105, USA) para aumentar el grado de pureza del mRNA. Para ello se transfirió la solución de alcohol a una columna, se centrifugó a 12.000  $xg$  por 2 minutos, de manera de dejar el ácido nucleico en el filtro de la columna. Posteriormente, se lavó la columna con etanol

al 75%, se centrifugó a 12.000  $xg$  por 2 minutos repitiendo una vez más el lavado. Finalmente, se resuspendió en 60  $\mu L$  de agua libre de nucleasas, almacenándose a  $-80^{\circ}C$  hasta su utilización para estudio (95,96).

Se determinó la concentración de RNA, utilizando un lector espectrofotométrico realizando una relación  $OD_{260nm}$  y  $OD_{280nm}$  y calculando la concentración de RNA obtenido. El cDNA se sintetizó mediante transcripción reversa utilizando el kit de *Thermoscientific RevertAid*. Se añadió alrededor de 4  $\mu g$  de RNA total, 100 pmol de *Random Hexamers* y hasta 12,5  $\mu L$  de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). Se calentaron los tubos a  $65^{\circ}C$  por 5 minutos y fueron colocados en hielo para luego añadir 4  $\mu L$  de Buffer de reacción 5X, 20U del inhibidor de RNasa Thermo scientific Ribolock, 2  $\mu L$  de una mezcla de desoxirribonucleotidos trifosfatos (dNTPs) Thermo scientific de 10 mM cada uno y 1  $\mu L$  de la transcriptasa reversa RevertAid por cada muestra. Luego se incubó a  $25^{\circ}C$  por 10 minutos y a  $42^{\circ}C$  por 60 minutos. La reacción se terminó calentando a  $70^{\circ}C$  por 10 minutos. El producto obtenido se utilizó directamente y tenía una concentración de 100 ng/ $\mu L$ .

Se realizó una amplificación de las secuencias parciales de DNA codificantes de RETA, RETB, receptores de serotonina 5HT2 (A y B), 5HT 1B/D, TBXAS1, eNOS, Arg-2, sGC subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , PKG-1, ROCK-2 y PDE-5. Se utilizó como control el cDNA obtenido de 18S-rRNA a partir del RNA total. La amplificación se llevó a cabo usando Taq polimerasa (Promega),  $MgCl_2$ , una mezcla de dNTPs y partidores específicos diseñados por el laboratorio a cada gen (Tabla 1). La reacción se realizó utilizando un termociclador (Smart Gradient PCR T960, Jingle). Luego una muestra de cada producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, se tiñó con RedGel (Biotium) y el producto se visualizó mediante luz ultravioleta. Las señales obtenidas se cuantificaron mediante un análisis de densitometría utilizando el programa Scion Image (Scion Image Beta 4.02, Scion Corporation).

**Tabla 2. Partidores para PCR**

Gen	sentido (5'-3')	antisentido (3'-5')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño Producto (bp)	Cantidad cDNA (ng)
18S rRNA	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	50	141	2
eNOS	TCAGCTCGCCAAGGTGACCAT	TGGCTGGTAGCGGAAGG	55.7	202	3
sGC $\alpha$	GAATCTTCCAGGGTGATG	TCCGAGAAGAGCATGGTGAC	51	370	3
sGC $\beta$	GGGCCATGAAGATTGTCAAC	CCCCAACAGTCTCCACCTTA	52	105	1
PKG-1	CTGGAGGAAGACTTTGCCAAGATTC	TCGGATTTGGTGAAGTCCGGAATG	55	253	3
PDE-5	CARAAYTTYCARATGAAMCAYGA	RTTYTPYTTYTCYCKRTTCAT	55	700	5
Arg-2	GACACTGCCAGACCTTTGT	GACCTTCTGGATACCAAGTCG	58	300	1
ROCK 2	GCCCGGTTAAGGAAAACACAGGCA	TCCATGGGTTTCGGTCCCTCCT	59	177	1
5HT 1B/D	TGTGGGTCTTCTCCATCTGC	GTTCTGTTGGGCGTCTGTTT	59	220	1
5HT 2A	CTCAGAAAATCGAACCAACC	GGCGAGTGACATCAGGAAA	59	208	10
5HT 2B	TTTACTTTATGTGGTGCCCCTT	GCATCCCGAAATGTCTTGTT	59	171	0,5
RETA	TTTTCATCGTGGGAATGGTG	GAAAGGATCCAGATGGAGAC	59	375	15
RETB	CGAGCTGTTGCTTCTTGAG	TTGCTCACCAAATACAGAGC	59	571	50
TXS	CGGATTTTGCCCAATAAGA	AAAGACCTGACGGACGATG	59	192	1

### 3.6. Análisis estadístico.

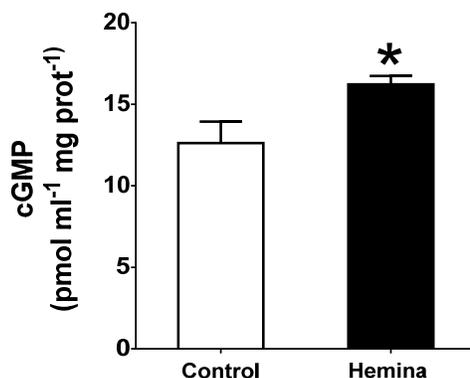
Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar medio. Se analizaron los datos mediante *t*-test de *Student* no pareado. Se consideró significativo un valor de p igual o menor que 0,05 (97). En estudios anteriores, con un número 4-5 de animales, se ha encontrado variaciones fisiológicas y moleculares significativas.

## IV RESULTADOS.

El primer objetivo de esta memoria era determinar si la vasodilatación de las arterias pulmonares pequeñas en ovejas recién nacidas inducida por cGMP es exacerbada por hemina lo cual en primer lugar fue determinado por el contenido total de cGMP del tejido pulmonar de RNOV.

### 4.1. Efecto de la administración de hemina en la producción de cGMP en el tejido pulmonar de RNOV.

Al determinar el contenido de cGMP en el tejido pulmonar se observó que existe un aumento en la cantidad de cGMP total en el tejido pulmonar del grupo hemina con respecto al grupo control ( $12,62 \pm 1,33$  pmol ml<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup> grupo control versus  $16,22 \pm 0,52$  pmol ml<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup> grupo hemina) (Figura 9).



**Figura 9.** Efecto de la administración de hemina en la producción de cGMP en tejido pulmonar de RNOV.

RNOV hemina (negro, n=4) y control (blanco, n=4).  $p < 0,05$ : t- Test no pareado, \* vs control

El primer objetivo de esta memoria fue determinar si la administración de hemina, un inductor y activador de la vía mediada por hemoxigenasa, produce en la circulación pulmonar neonatal, una exacerbación de la vía vasodilatadora dependiente de cGMP. Para determinar el mecanismo por el cual ocurre esta exacerbación se realizó la revisión del mecanismo probable de este aumento del contenido cGMP mediante miografías de alambre a las arterias pulmonares

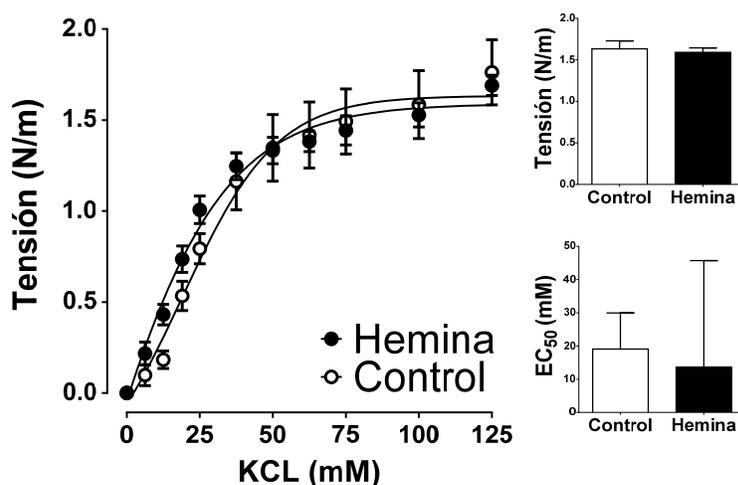
pequeñas y expresiones génicas de los niveles génicos de receptores o proteínas efectoras pertenecientes a la vía dependiente de cGMP.

#### 4.2. Efecto de la administración de hemina en la reactividad vascular de arterias pulmonares pequeñas de RNOV.

##### 4.2.1. Respuesta a K<sup>+</sup>.

Se verificó la reactividad vascular de las arterias pulmonares pequeñas mediante miografías de alambre, para determinar el mecanismo por el cual ocurre esta exacerbación de la vía dependiente de cGMP, en primera instancia se determinó la reactividad vascular basal de las arterias pulmonares.

Como se observa en la figura 10 no existe una diferencia significativa en la tensión o contracción en el grupo hemina, respecto al grupo control (1,634 N/m ± 0,094 N/m en grupo control vs 1,590 N/m ± 0,055 N/m en grupo hemina).



**Figura 10.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a KCl en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV control (blanco; n=5) y RNOV tratado con hemina (negro; n=5).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs control

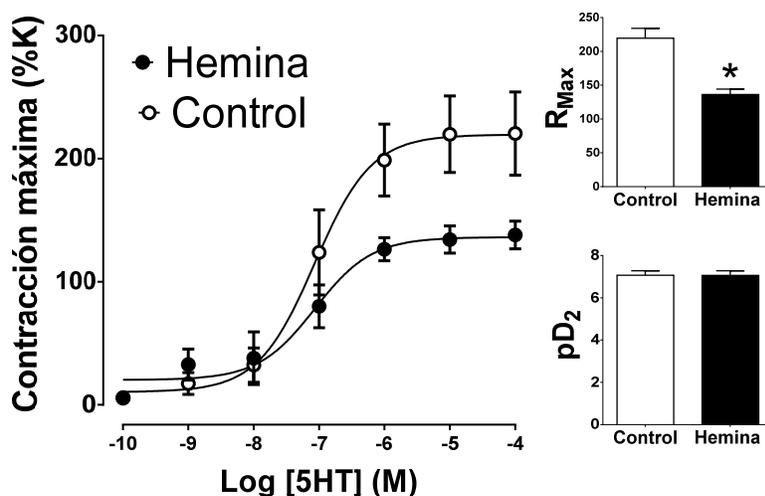
Esto nos indicaría que la capacidad contráctil, dependiente de canales iónicos, de los vasos no varía frente a la estimulación de la vía cGMP por medio de la administración de Hemina, y por lo tanto se realizó una prueba de la respuesta

frente a una serie de vasoconstrictores más potentes para determinar la respuesta contráctil.

#### 4.2.2. Respuesta Vasoconstrictora de las arterias pulmonares.

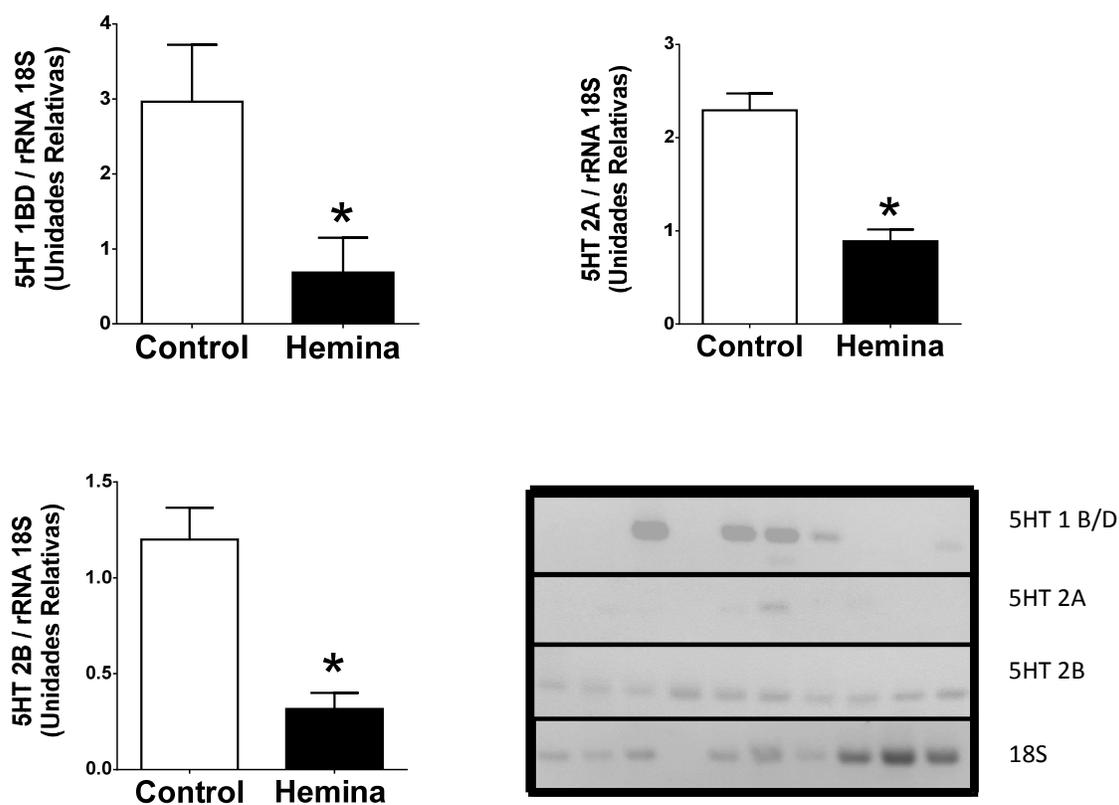
Para evaluar la capacidad contráctil arterial, se realizaron miografías frente a los vasoconstrictores: 5-HT, ET-1 y U46619, y luego analizados con respecto a una dosis submáxima de KCl 62,5 mM.

En el caso de 5HT (Figura 11) se observó una disminución significativa en la contracción máxima en el grupo hemina respecto al grupo control ( $219,5 \pm 14,7\%$  grupo control versus  $136,2 \pm 8,1\%$ , respectivamente). No se observó diferencia significativa en la potencia. Lo que puede ser interpretado como una variación en el número de receptores, mas que una modificación en la función de ellos.



**Figura 11.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a Serotonina (5-HT) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV control (blanco; n=4) y RNOV tratado con hemina (negro; n=3).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs R<sub>max</sub> control

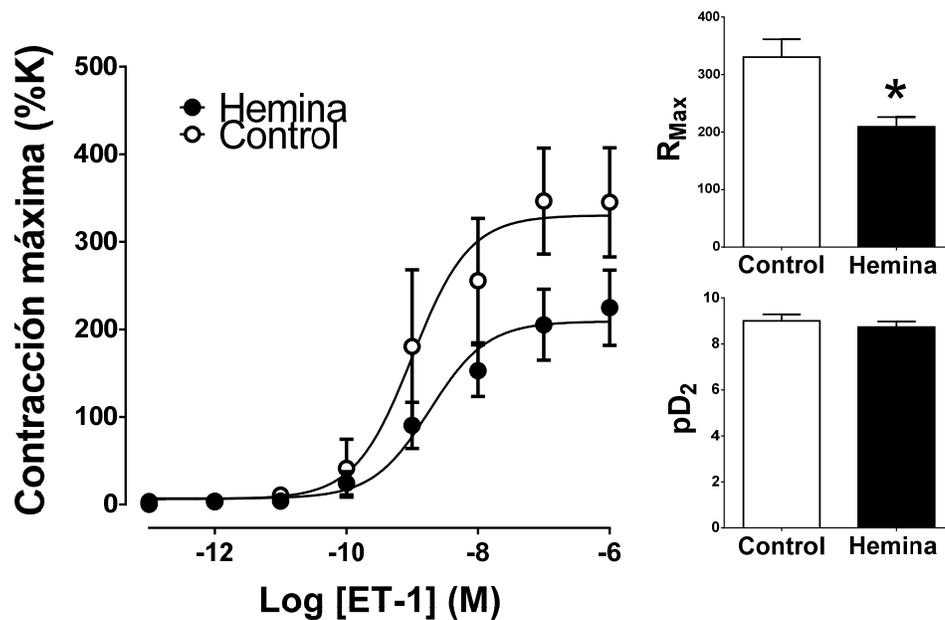
Al evaluar la expresión génica de los receptores de serotonina 1B/D ( $2,97 \pm 0,76$  U.R. grupo control versus  $0,69 \pm 0,47$  U.R. grupo hemina), 2A ( $2,30 \pm 0,18$  U.R. grupo control versus  $0,89 \pm 0,13$  U.R. grupo hemina) y 2B ( $1,20 \pm 0,17$  U.R. grupo control versus  $0,32 \pm 0,08$  U.R. grupo hemina) se encontró significativamente disminuidas en el grupo hemina respecto al grupo control, en los tres genes estudiados (Figura 12).



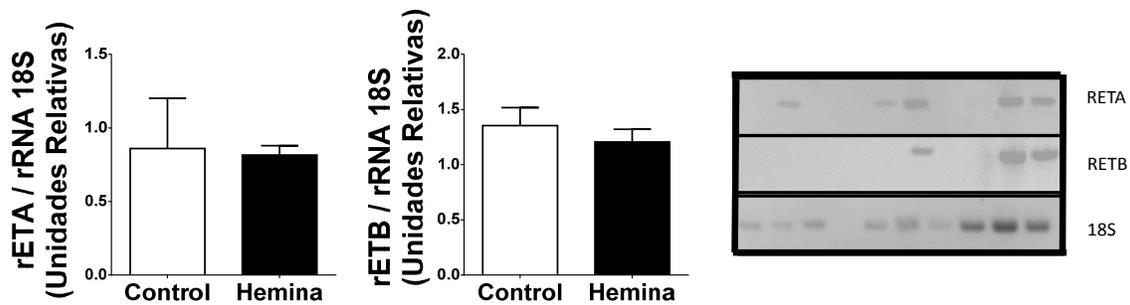
**Figura 12.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de 5HT1B/D, 5HT2A y 5HT2B en tejido pulmonar de RNOV. RNOV control (blanco; n=3) y RNOV tratado con hemina (negro; n=3).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs control

Otro potente vasoconstrictor de la circulación pulmonar es la ET-1, frente a concentraciones crecientes de este agonista se observó una disminución significativa en la contracción máxima, en el grupo hemina ( $330,4 \pm 30,9\%$  grupo control versus  $209,2 \pm 16,8\%$  grupo hemina). Al evaluar la función del receptor mismo, no se observó diferencia significativa en la potencia de la curva de ET-1 (Figura 13).

Al indagar si hubo variación en la expresión génica de los receptores de endotelina A ( $0,86 \pm 0,34$  U.R. grupo control vs  $0,81 \pm 0,06$  U.R. grupo hemina) y receptores de endotelina B ( $1,35 \pm 0,16$  U.R. grupo control versus  $1,21 \pm 0,12$  U.R. grupo hemina) se pudo establecer que no presentaron diferencias significativas (Figura 14).

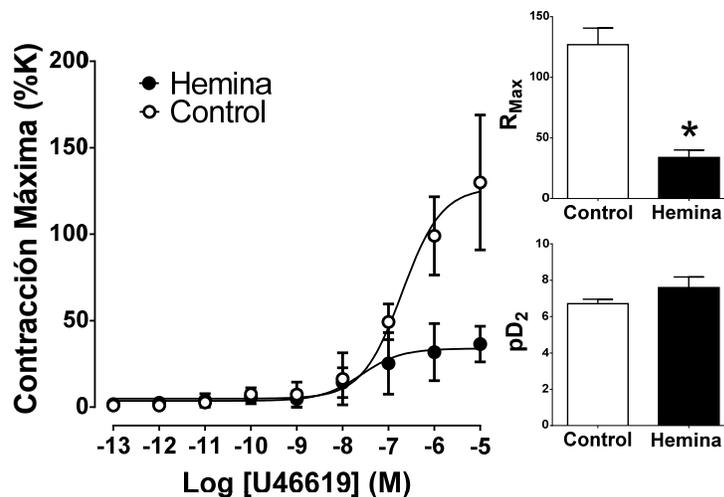


**Figura 13.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a endotelina (ET-1) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV control (blanco; n=4) y RNOV tratado con hemina (negro; n=6).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs R<sub>max</sub> control



**Figura 14.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de receptores de endotelina (RETA y RETB) en tejidos pulmonares de RNOV. RNOV control (blanco; n=3) y RNOV tratado con hemina (negro; n=4).

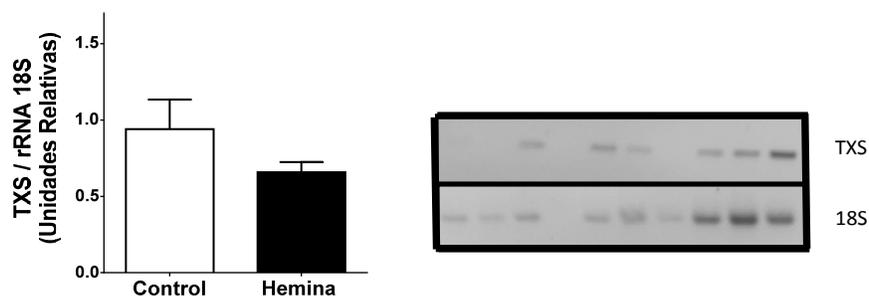
Al utilizar el análogo de tromboxano A<sub>2</sub> U46619 en la CCR de contracción se observó una disminución significativa en la contracción máxima, en el grupo hemina respecto al grupo control ( $127,00 \pm 13,57\%$  grupo control versus  $33,86 \pm 6,19\%$  grupo hemina). No se observó diferencia significativa en la potencia (Figura 15).



**Figura 15.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta contráctil a tromboxano (U-46619) en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV control (blanco; n=3) y RNOV tratado con hemina (negro; n=4).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs R<sub>max</sub> control

Una proteína que es crucial para la señalización dependiente de tromboxano es la sintasa de tromboxano, al evaluar su expresión génica, pudimos observar que

en el grupo hemina no presentó diferencia significativa con respecto al grupo control ( $0,94 \pm 0,19$  U.R. grupo control versus  $0,66 \pm 0,07$  U.R. grupo hemina) (Figura 16).



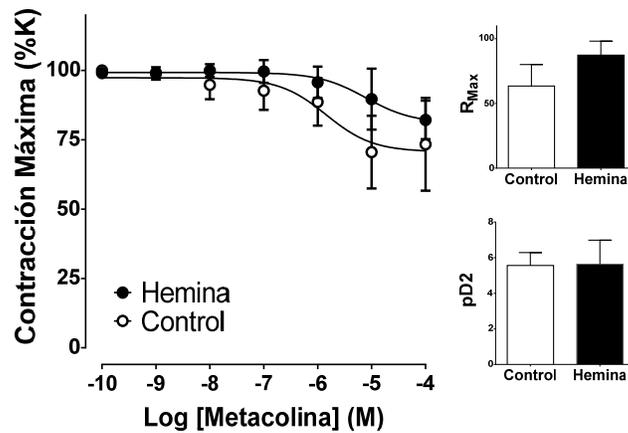
**Figura 16.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de la síntesis de tromboxano (TXS) en tejidos pulmonares de RNOV. RNOV control (blanco; n=4) y RNOV tratado con hemina (negro; n=5).

#### **4.3. Efecto de la administración de hemina en la relajación mediada por el endotelio en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.**

Habiendo definido inicialmente que la vasodilatación es dada por o una remoción del estímulo contráctil mediante la inhibición de la acción de la MLCK o un aumento de la actividad de la MLCP o por una inhibición de la acción contráctil (1,3,25), se realizó una serie de curvas para determinar el efecto de la administración de hemina y por lo tanto una inducción de la vía HO en la relajación, inicialmente se realizó una prueba de la relajación mediada por el endotelio. Esta relajación se midió con respecto a una contracción previa a la realización de la CCR de los fármacos vasorelajantes y los resultados se expresan con respecto a este 100% de la contracción inicial.

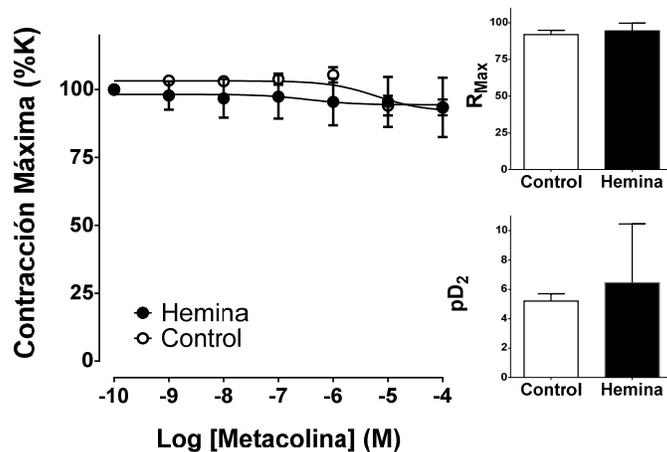
La relajación de los vasos sanguíneos es producto principalmente de la producción de NO endotelial (EDNO) y de la producción de prostaglandinas por parte del endotelio (3). El NO difunde a las SCM donde activan las proteínas encargadas de la vasodilatación (3).

En primera instancia revisaremos la respuesta vasorelajante dependiente del endotelio al utilizar el análogo de la acetilcolina, metacolina. Al estudiar la relajación máxima, no se observó diferencias significativas entre ambos grupos ( $63,48 \pm 16,54\%$  grupo control versus  $87,36 \pm 10,87\%$  grupo hemina) (Figura 17).



**Figura 17.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=6).

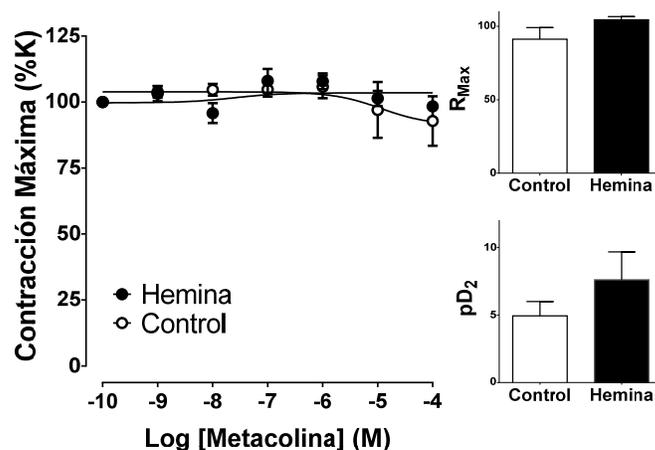
Al utilizar el inhibidor de prostanoïdes (Indometacina) en conjunto con L-Name, se evaluó la respuesta del endotelio independiente de NO y de prostanoïdes y no se observó una diferencia significativa entre los grupos (91,95 ± 2,93% grupo control versus 94,40 ± 5,38% grupo hemina) (Figura 18).



**Figura 18.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de inhibir con L-name e indometacina en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=6).

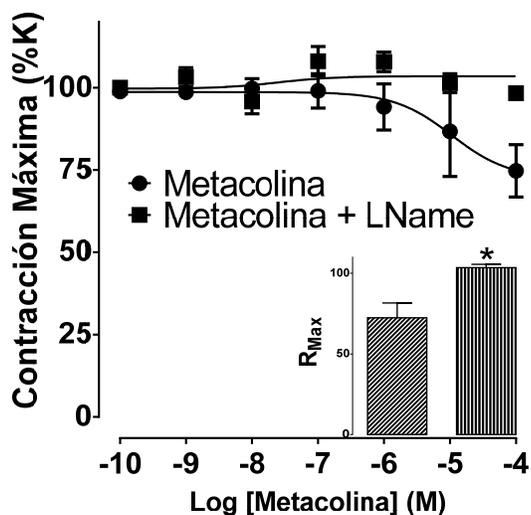
#### 4.4. Efecto de la administración de hemina en la relajación dependiente de eNOS en el endotelio, en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.

Al utilizar el bloqueador de eNOS, L-Name, para evaluar la respuesta del endotelio independiente de NO no se observó una diferencia significativa entre los grupos ( $91,27 \pm 7,89\%$  grupo control versus  $104,50 \pm 2,11\%$  grupo hemina) (Figura 19).



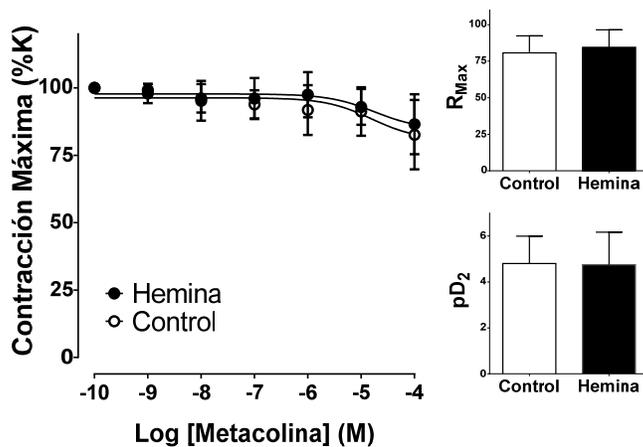
**Figura 19.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de bloquear con L-Name en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=6).

Para determinar el efecto de la administración de hemina en la vasorelajación dependiente de eNOS, se realizó la comparación del grupo metacolina hemina ( $92.44 \pm 9.13$  %) con el grupo metacolina hemina previo bloqueo de eNOS mediante L-Name ( $103,5 \pm 2,11$  %). Se observó una diferencia significativa en la Rmax de relajación (Figura 20).



**Figura 20.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta a metacolina en presencia o ausencia del bloqueador L-Name en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV metacolina hemina (círculo negro, n=5) y RNOV metacolina hemina + LName (cuadrado negro, n=6).

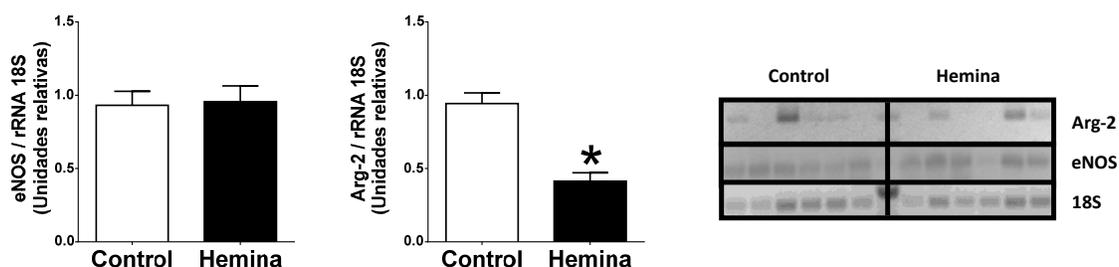
Para determinar el efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante dependiente de la regulación por parte de Arg-2 mediada por el endotelio, se utilizó BEC que es un inhibidor de la Arg-2. No se observó una diferencia significativa entre los grupos ( $80,69 \pm 11,63\%$  grupo control versus  $84,52 \pm 11,94\%$  grupo hemina) (Figura 21).



**Figura 21.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a metacolina después de bloquear con BEC en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=6).

La expresión génica de eNOS no presentó diferencia significativa en su expresión en el tejido pulmonar entre el grupo hemina y el grupo control ( $0,93 \pm 0,09$  U.R. grupo control versus  $0,96 \pm 0,11$  U.R. grupo hemina).

La expresión génica de Arg-2 es significativamente menor en el grupo hemina que en el grupo control ( $0,94 \pm 0,07$  U.R. grupo control versus  $0,41 \pm 0,06$  U.R. grupo hemina) (Figura 22).



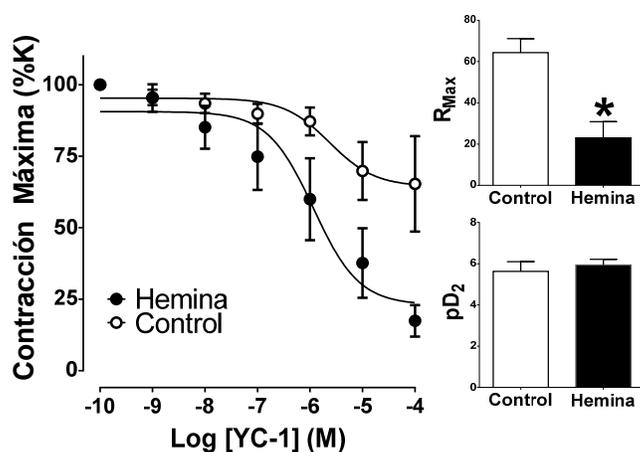
**Figura 22.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de eNOS y Arg-2 en tejido pulmonar de RNOV. RNOV control (Blanco, n=5) y RNOV hemina (Negro, n=6).  $p < 0,05$ : Test de t no pareado, \* vs control

Habiendo determinado la baja relajación mediada por el endotelio, se determinó la relajación dependiente de la respuesta a cGMP pero ahora con activación directa de las SCM.

#### 4.5. Efecto de la administración de hemina en la relajación muscular dependiente de cGMP, en arterias pulmonares pequeñas de RNOV.

##### 4.5.1. Efecto de la estimulación de sGC.

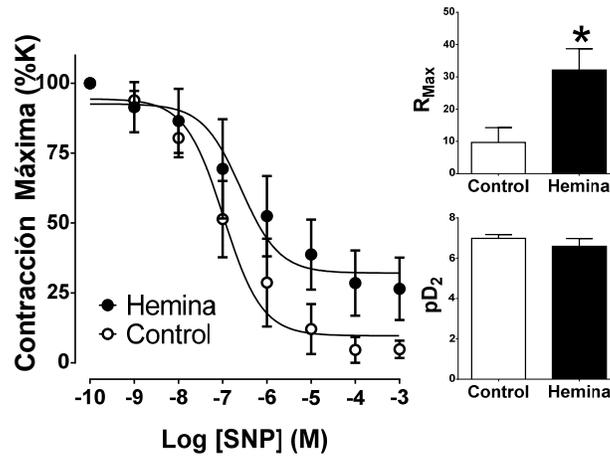
Se evaluó el efecto del tratamiento con hemina en la relajación mediada por la sGC, mediante el estimulador de ciclasa YC-1 que actúa estimulando químicamente la ciclasa de manera dependiente del grupo hemo. Se observó una disminución de la contracción máxima de las arterias pulmonares del grupo hemina respecto al control ( $64,37 \pm 6,79\%$  grupo control versus  $22,99 \pm 7,92\%$  grupo hemina) (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a YC-1 en arterias pulmonares pequeñas en RNOV.

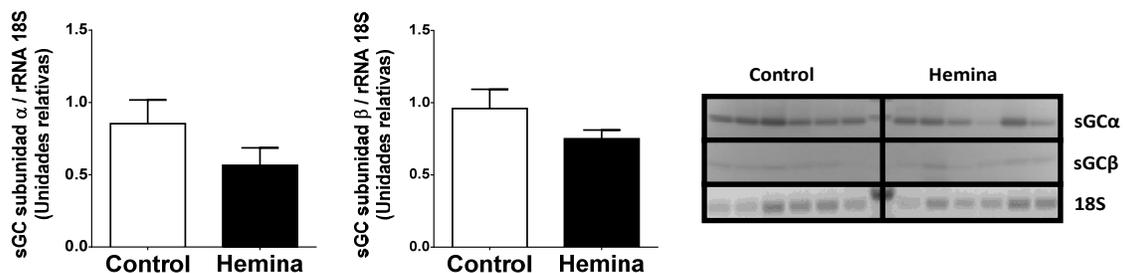
RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=6),  $p < 0.05$ : Test no pareado, \* vs control

Se evaluó el efecto del tratamiento con hemina en la relajación mediada por la sGC utilizando un dador de NO (SNP). Se observó una disminución en la vasorelajación de la arteria del grupo hemina con respecto al grupo control que representa ( $9,67 \pm 4,57\%$  grupo control versus  $32,10 \pm 6,64\%$  grupo hemina) (Figura 24).



**Figura 24.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a SNP en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=5).  $p < 0.05$ : Test no pareado, \* vs control

Al medir la expresión génica de las subunidades de la sGC observamos que no existió una diferencia significativa entre ambos grupos ( $0,85 \pm 0,16$  U.R. grupo control versus  $0,57 \pm 0,12$  grupo hemina para sGC  $\alpha$  y  $0,96 \pm 0,13$  U.R. grupo control versus  $0,75 \pm 0,06$  U.R. grupo hemina para sGC  $\beta$ ) (Figura 25).

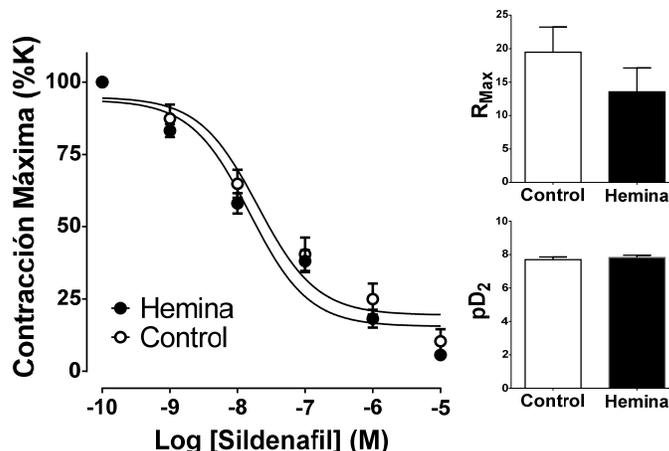


**Figura 25.** Efecto de hemina en la expresión génica de sGC $\alpha$  y sGC $\beta$  en tejido pulmonar. RNOV control (blanco, n=5) y RNOV hemina (negro, n=6).

Habiendo determinado el efecto de la administración de hemina en la relajación dependiente de la sGC, se observó la degradación de cGMP por parte de PDE-5 y se determinó el efecto de la administración de hemina en esta degradación.

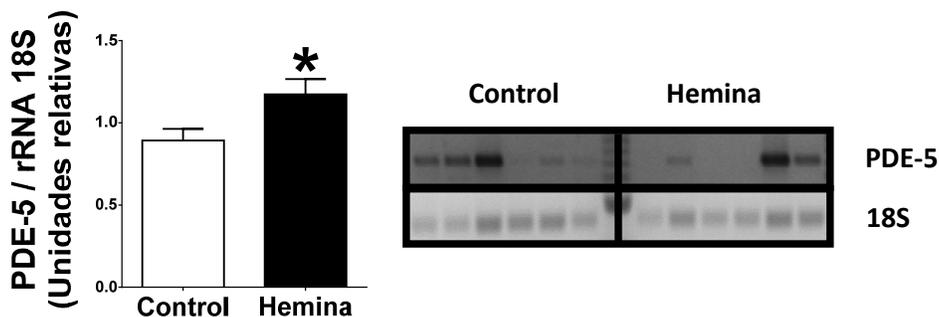
#### 4.5.2. Efecto en la función de PDE-5.

Se evaluó el efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a sildenafil, un bloqueador de la PDE-5, y por esto, un inhibidor de la degradación del cGMP. Frente a este inhibidor, no se observó una diferencia significativa en la respuesta de las arterias entre ambos grupos ( $19,46 \pm 3,76\%$  grupo control versus  $15,53 \pm 3,59\%$  grupo hemina) (Figura 26).



**Figura 26.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a Sildenafil en arterias pulmonares pequeñas en RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=4).

Al estudiar, la expresión de la PDE-5, se pudo observar un aumento en la expresión génica de la PDE-5 en el grupo hemina con respecto al grupo control ( $0,89 \pm 0,07$  U.R. grupo control versus  $0,32 \pm 0,05$  U.R. grupo hemina) (Figura 27).

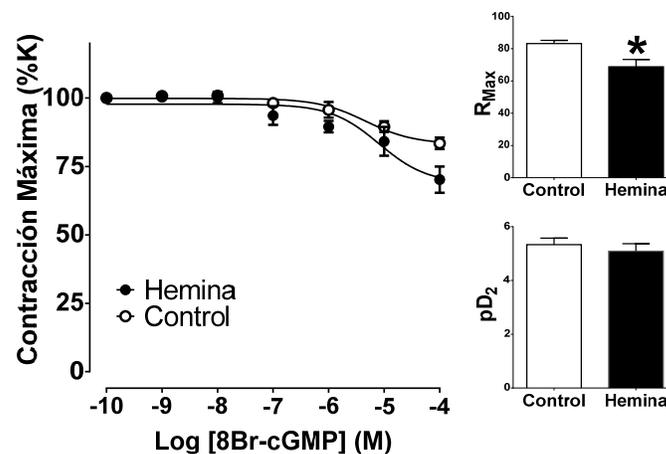


**Figura 27.** Efecto de hemina en la expresión génica de PDE-5 en tejido pulmonar de RNOV. RNOV control (blanco, n=5) y RNOV hemina (negro, n=6)  $p < 0,05$ : Test no pareado, \* vs control.

Luego de haber determinado el efecto de la administración de hemina en la producción y degradación de los niveles de cGMP, se realizó la determinación de la respuesta río abajo de cGMP para estudiar el efecto de la administración de hemina en la respuesta dependiente de cGMP.

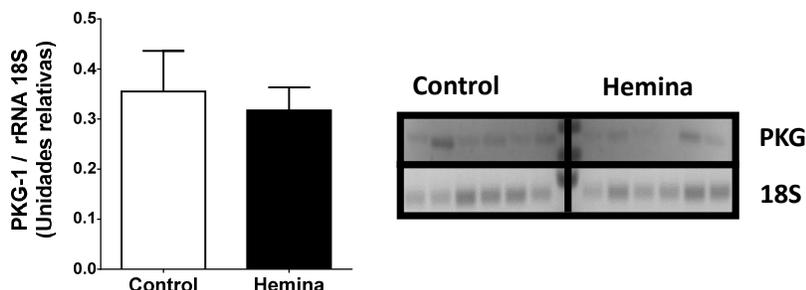
#### 4.6. Efecto de la administración de hemina en la relajación dependiente de cGMP mediada por el músculo liso pulmonar.

Se evaluó la relajación de los vasos, específicamente, los mecanismos río abajo de la sGC mediante una CCR a 8Br-cGMP, que es un análogo exógeno del cGMP que activa directamente la PKG. Se observó un aumento de la relajación por parte del grupo hemina ( $83,22 \pm 1,96\%$  grupo control versus  $68,79 \pm 4,48\%$  contracción máxima grupo hemina) (Figura 28).



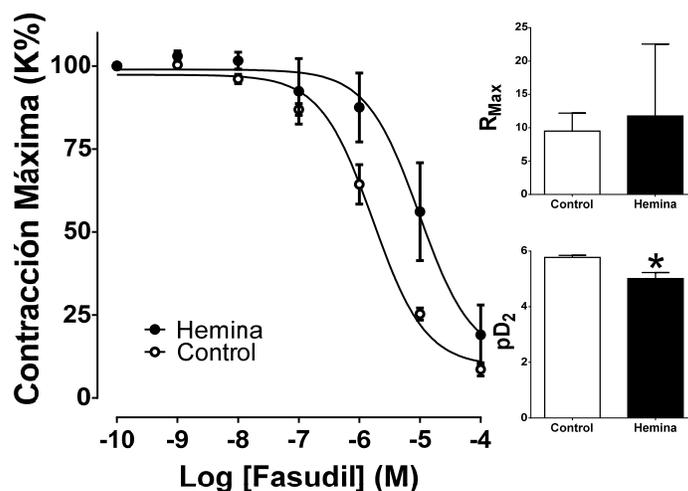
**Figura 28.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a 8Br-cGMP en arterias pulmonares pequeñas en RNOV  
RNOV control (blanco, n=3) y RNOV hemina (negro, n=3).  $p < 0,05$ : Test no pareado, \* vs control.

No se observó una diferencia significativa en la expresión génica de PKG del tejido pulmonar no existe una diferencia significativa entre los grupos ( $0,36 \pm 0,08$  U.R. grupo control versus  $0,32 \pm 0,05$  U.R. grupo hemina) (Figura 29).



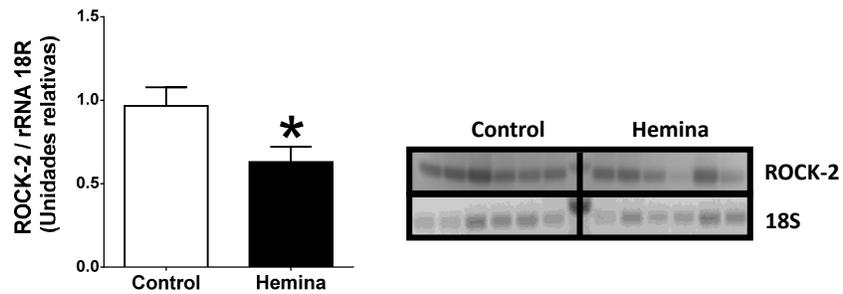
**Figura 29.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de PKG-1 en tejido pulmonar de RNOV. RNOV control (blanco, n=4) y RNOV hemina (negro, n=4).

Al inhibir ROCK-2 utilizando fasudil no se observó diferencia significativa en la respuesta máxima de relajación de los vasos, pero si se observó una disminución significativa a la potencia presentada al fasudil ( $5,77 \pm 0,07$  grupo control versus  $5,01 \pm 0,21$  grupo hemina) (Figura 30).



**Figura 30.** Efecto de la administración de hemina en la respuesta vasorelajante a fasudil en arterias pulmonares pequeñas de RNOV. RNOV control (Blanco, n=4) y RNOV hemina (Negro, n=3).  $p < 0,05$ : Test no pareado, \* vs control

Si analizamos los cambios en la expresión génica de ROCK-2, observamos una disminución significativa de la expresión génica de ROCK-2 en el tejido pulmonar del grupo hemina con respecto al grupo control ( $0,97 \pm 0,11$  U.R. grupo control versus  $0,63 \pm 0,09$  U.R. grupo hemina) (Figura 31).



**Figura 31.** Efecto de la administración de hemina en la expresión génica de ROCK2 en tejido pulmonar de RNOV. RNOV control (blanco, n=6) y RNOV hemina (negro, n=5).  $p < 0,05$ : Test no pareado, \* vs control.

## V DISCUSIÓN.

El primer objetivo de esta memoria fue determinar si la administración de hemina, un inductor y activador de la vía mediada por hemoxigenasa, produce en la circulación pulmonar neonatal, una exacerbación de la vía vasodilatadora dependiente de cGMP lo cual comprueba la hipótesis inicialmente planteada.

Al iniciar la discusión de los hallazgos encontrados en esta memoria, podemos decir, que los canales de potasio son las vías conductivas dominantes de las SCM vasculares. La adición de potasio depolariza las membranas, abriendo los canales de calcio dependientes de voltaje, resultando en vasoconstricción (98–100). La respuesta de los vasos frente a la misma concentración de KCl fue igual en el grupo tratado con hemina que en el grupo control lo que nos puede estar diciendo que no existe diferencia en la capacidad reactiva basal al inducir la vía dependiente de cGMP. Sin embargo, la respuesta contráctil disminuyó frente a estímulos constrictores más potentes, como fueron la administración de ET-1, serotonina y U46619, al administrar hemina en los recién nacidos. Un estudio realizado en cultivo celular proveniente de ratas, sugiere la existencia de una interacción parcial entre las vías de RhoA y ERK1/2 (27). Esta vía mediaría la proliferación estimulada por 5HT en hipertensión pulmonar (27). Además estas dos vías están moduladas de manera separada por el aumento de la señalización cGMP-PKG derivada de una inhibición de la PDE-5 con Sildenafil (27). En otro estudio *in vitro* de células neuronales, en que se evaluó la activación de PKG en los receptores de 5HT, se observó que si bien la activación de PKG lleva a la activación mediante fosforilación de SERT, esta acción no es directa, sino que involucra una quinasa aún no identificada (101). Quizás exista algún tipo de mecanismo similar con los receptores de serotonina de las arterias pulmonares y es una ventana que queda abierta para continuar estudiando. Ambos estudios indican que la disminución de la función de PDE-5 y el aumento de la función de PKG producirían la disminución de la reactividad a 5HT (27,101). Esta disminución de respuesta a 5HT puede estar también relacionada a una menor expresión de sus receptores (3), lo que concuerda con lo encontrado en esta memoria, donde pudimos observar que los niveles de

expresión génica de los receptores 5HT 1B/D, 2A y 2B se encuentran disminuidos en el grupo hemina.

Se ha descrito previamente, una comunicación cruzada entre las vías de NO y ET-1 (102). El NO reduce o bloquea el efecto constrictor de ET-1 en arterias normales humanas, al inhibir la transcripción basal de ET-1, y la salida de este agonista de las células, en un mecanismo cGMP-dependiente pero quinasa independiente (102). Además, el NO disminuye el tiempo de interacción de ET-1 con sus receptores (102) y bloqueando la liberación de calcio de maneras tanto sGC-dependiente como independiente, inhibiendo por lo tanto el aumento del  $[Ca^{+2}]_i$  (102). De esta manera el bloqueo de la producción de NO puede resultar en hipertensión (103,104). Por otra parte se conoce también que en la hipoxia crónica, ET-1 atenúa la vasodilatación dependiente de NO (28,102–105). De esta manera la disminución de la respuesta a ET-1 al activar la vía cGMP podría explicarse por la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina y el aumento del cGMP disponible, y ya no exclusivamente por efecto del NO.

En el caso de la vasorrelajación observada en arterias pulmonares pequeñas, la respuesta a metacolina, la cual representa la respuesta prioritaria de relajación por parte del endotelio, no tiene diferencia entre grupo hemina y control. Tampoco se observa diferencias en ninguno de los bloqueos estudiados. Si encontramos diferencia en la relajación mediada por eNOS con la relajación total por parte del endotelio. Este último resultado sugiere la importancia del NO en la relajación mediada por el endotelio. Existen antecedentes donde la respuesta a metacolina, mediante la activación de los receptores muscarínicos de la célula endotelial, es baja en recién nacidos sanos (2,11,14). Así, la baja relajación por parte de metacolina y la preponderancia de la respuesta dependiente de NO en la relajación mediada por el endotelio coinciden con lo estudiado en la literatura (2,3,11,14).

Al medir las expresiones génicas de eNOS y Arg-2, se detectó diferencia en la expresión de eNOS, sin embargo, Arg-2 mostró una disminución en su expresión en el grupo hemina con respecto al grupo control. Estudios en arterias y venas umbilicales de embarazos humanos sanos demostraron que la Arg-2 está presente en el endotelio arterial umbilical (47). Su principal rol es el de ser regulador negativo

de la vasodilatación dependiente de NO (47). Una exacerbación de la vía de HO y por lo tanto un aumento del cGMP podría quizás llevar a una regulación negativa en la expresión de Arg-2. Sin embargo, no se observó una diferencia en la relajación mediada por el endotelio al inhibir la Arg-2. Entonces, con nuestros resultados no se puede dilucidar si la diferencia entre la expresión y la función de Arg-2 es debido a la baja relajación mediada por endotelio en recién nacidos sanos o por algún mecanismo adicional de regulación de la función de Arg-2.

En la reactividad vascular del músculo liso, la relajación fue mayor en presencia del estimulador de sGC NO-independiente pero hemo-dependiente YC-1. Contrariamente, al utilizar un estimulador dador de NO como el SNP, el grupo tratado con hemina tuvo menor relajación que el grupo control. No se encontró diferencia significativa en las expresiones de las subunidades de sGC en el grupo hemina con respecto al grupo control.

¿Puede la estimulación de la vía de HO por el tratamiento con hemina afectar la regulación de la actividad o la respuesta a NO por parte de la sGC? Existen antecedentes de la activación diferencial de sGC por parte de NO y CO (106). NO se une en la sexta posición de coordinación del  $Fe^{2+}$  del grupo hemo (106). La formación de este enlace produce la ruptura del enlace entre el  $Fe^{2+}$  del grupo hemo y el nitrógeno de la histidina, volviendo a generar un compuesto pentacoordinado pero con NO en la quinta posición (106). Esta unión induce un cambio conformacional en la enzima que lleva a un incremento de la actividad de sGC en 200 veces (106). En cambio, CO sólo es capaz de generar la unión con  $Fe^{2+}$ , formando también un compuesto hexacoordinado con una alta afinidad, pero con una baja actividad catalítica (4 veces) (106). Esto es debido a la incapacidad de romper el enlace con el nitrógeno de la histidina (106). Por lo tanto, no genera el cambio conformacional necesario para aumentar la actividad de sGC (106,107).

Se ha sugerido un papel modulador del CO sobre la actividad de sGC, ya que incrementa de manera significativa los incrementos de cGMP inducidos en respuesta a NO (106–108). Este hecho es explicado por la geometría de la unión de los ligandos (NO y CO), que son en lados opuestos del grupo hemo, formando aductos estables (106). Además existe una respuesta aumentada de YC-1 en

presencia de CO en estudio en arterias bovinas (107). Su activación se determinó mediante estudio de estructura proteica utilizando el sitio de unión de la sGC a NO y CO (106–109).

El estudio de células endoteliales humanas observó que YC-1 inhibe la proliferación celular en una vía independiente de cGMP, activando el arresto celular, inhibiendo el sistema de ciclinas-CDK y aumentando los niveles proteicos de p21 y p27 (110). En un estudio de cultivo de células epiteliales, se mostró que YC-1 activa la vía de ciclo oxigenasas, mediante el aumento de la actividad de PKC y la vía de señalización de las MAPK, llevando a la expresión de COX-2 (111). Esto lo podemos extrapolar a nuestro modelo de célula endotelial. Sería interesante estudiar si la razón del aumento de la respuesta a YC-1, en comparación a un dador de NO como el SNP, es mayor por una comunicación cruzada de vías sinérgicas en la relajación del vaso (111).

Podemos observar que hasta el momento existe un aumento de la cantidad disponible de cGMP y un aumento de la preponderancia de la respuesta dependiente de eNOS en el endotelio en el grupo tratado con hemina sin una diferencia en la respuesta directa al NO, pero si un aumento de la respuesta conjugada entre CO y NO por parte de la ciclasa. Queda entonces la interrogante de si este aumento de cGMP produce algún cambio en la regulación de los mismos niveles de cGMP por parte de la PDE-5. Determinamos en esta memoria que no existe diferencia en la función de la PDE-5 aunque si existe un aumento significativo en los niveles de mRNA de PDE-5 en el grupo tratado con hemina. ¿Será esta disociación entre expresión y función proteica por una diferencia en la regulación post-transcripcional la que evita el aumento de la función o un aumento en la degradación, serán los niveles aumentados de cGMP el que regula la actividad de PDE-5?

En esta memoria se observó que existe una disminución de los niveles de PDE-5 sin cambios en la respuesta al inhibidor Sildenafil, y que además existe un aumento de la respuesta de PKG sin cambios en su expresión, lo que concuerda con lo observado en la literatura consultada, que describe como la inhibición de la PDE-5, llevando a una disminución de la degradación de cGMP y por lo tanto

aumentando la cantidad de cGMP disponible, regula la recaptación de los receptores de 5HT y a una inhibición de la respuesta efectora de 5HT (27,101).

Existen antecedentes de la unión no catalítica de cGMP y que la fosforilación de la Serina 92 de la PDE-5 es dependiente de esta unión (112). Este sitio de unión es conservado en las isoformas de bovinos, humanos, caninos y ratas y se reportó que la fosforilación *in vitro* puede ser efecto de PKG (113). En específico en enzima purificada de pulmón bovino, la incorporación de <sup>32</sup>P a PDE-5 es observada sólo en presencia de cGMP (113), con un aumento de un 50-70% de la actividad de un recombinante parcialmente purificado de PDE-5 bovino (65). Utilizando anticuerpos específicos a la fosfoserina 92 de PDE-5 de bovino en SMC intactas, se determinó que PKG es un gran regulador de la actividad y fosforilación de PDE-5 (114). Con estos antecedentes podemos inferir que el aumento de los niveles de cGMP regulan positivamente la fosforilación y por lo tanto la actividad y el aumento de la expresión de PDE-5. En esta memoria no observamos diferencia en la función de PDE-5 a pesar del aumento de la expresión, ¿Podrá el tratamiento con hemina influir en la actividad de PDE-5 de manera negativa?. Un estudio en tejido cavernoso de ratas estudió la relación entre la vía HO-cGMP con inhibidores de PDE-5 (115). Se observó que al inhibir la PDE-5 existe un aumento en la actividad de HO y en los niveles de cGMP (115). Este aumento se revertía al inhibir a HO (115). Se concluyó que el efecto de los inhibidores de PDE-5 están parcialmente mediados a través de HO, lo que podría explicar por qué en el grupo tratado con hemina no observamos una diferencia en la función de la PDE-5 (115,116).

La relajación del vaso mediada por PKG mediante la activación directa de esta utilizando un análogo de cGMP, fue mayor en el grupo hemina al compararla con el grupo control, sin diferencia significativa en la expresión génica del receptor. En casos de hipoxia donde la vía cGMP se encuentra disminuida, existe un aumento de la expresión y actividad de PKG-1 al tratar con hemina (117). En este caso observamos que no existe diferencia en la expresión pero que la función de PKG es mayor que en el grupo control. Esto nos indica una regulación positiva por parte de los niveles de cGMP a la actividad de PKG (117). Como ya observamos, el aumento de PKG puede regular los mismos niveles de cGMP mediante la activación de PDE-

5 (65,113,114). PKG está involucrada en la activación de MLCP (118,119). Esto favorece la relajación por acción directa en la desfosforilación de la MLC (118,119).

La activación de PKA por parte de una inducción de la actividad de PKG, fosforila BKCa favoreciendo la salida de  $K^+$ , produciendo una hiperpolarización (120,121). Esta hiperpolarización activa la MLCP relajando la vasculatura (120,121). La PKG activa la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del Retículo sarcoplásmico (SERCA), permitiendo la recaptación del  $[Ca^{2+}]_i$  al Retículo, promoviendo la relajación (122–124). Además inhibe la sGC al fosforilar la Ser64 de la subunidad  $\alpha$ , inhibiendo su actividad catalítica (125). La activación de PKG inhibe los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje al fosforilar la Ser 533 de la subunidad  $\alpha 1C$ , evitando el influjo de  $Ca^{2+}$  al citoplasma (123).

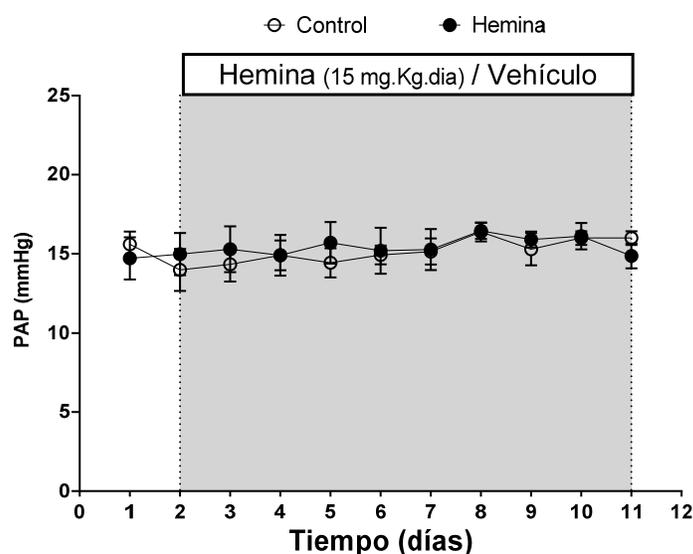
Al observar la respuesta río abajo de sGC, utilizando fasudil, un inhibidor de la ROCK, no hubo diferencia en la relajación. Sin embargo si se observó una disminución de la potencia de ROCK. Esto hace que la respuesta de relajación requiera de un aumento de la concentración del inhibidor de ROCK-2 que es acompañada además por una disminución de los niveles de ROCK 2. ¿Podrá esta disminución de la expresión de ROCK2 estar relacionada a la disminución de la capacidad contráctil del vaso?

En un estudio realizado en arterias carótidas de ratones mediante análisis de respuesta vasculares a pre contracciones y CCR de relajación a acetilcolina y dadores de NO, utilizando fasudil e Y27632 (un inhibidor de Rho quinasa) se concluyó que el fenotipo atípico de las células endoteliales de RN están mediadas por un aumento de la señalización Rho/ROCK (16). Esto producirá una disminución de la dilatación endotelial (16). Se señaló además que la retención del estado neonatal o la remanifestación del fenotipo endotelial del recién nacido contribuye al desarrollo de enfermedades vasculares al impedir el rol protector del endotelio (16).

Podemos resumir lo observado en esta memoria en el diagrama de la Figura 33. Nuestros datos permiten concluir que la administración de hemina en RNOV produce un aumento del contenido del cGMP disponible. Produce también la activación de los elementos de la vía vasodilatadora dependiente de cGMP, en específico un aumento de la actividad de PKG, efectora natural de cGMP. Por el

contrario a lo que se hubiese esperado, se encuentra disminuida la capacidad de respuesta a vasoconstrictores. El principal regulador de los niveles de cGMP, la PDE-5, se encuentra interesantemente disminuida, siendo el mecanismo probable encontrado con la revisión de los estudios previos externos, una regulación directa por la actividad aumentada de la HO-1. Sería esperable entonces esperar que la mPAP de estos RNOV se encontrara disminuida en el grupo hemina con respecto al control.

Sin embargo, es interesante observar que el aumento en la formación de cGMP, y exacerbación del tono vasodilatador en el tejido pulmonar, no llevó a una disminución de la mPAP en el modelo de estudio de RNOV (Figura 32, Ebensperger 2018 en preparación) durante la duración del estudio.

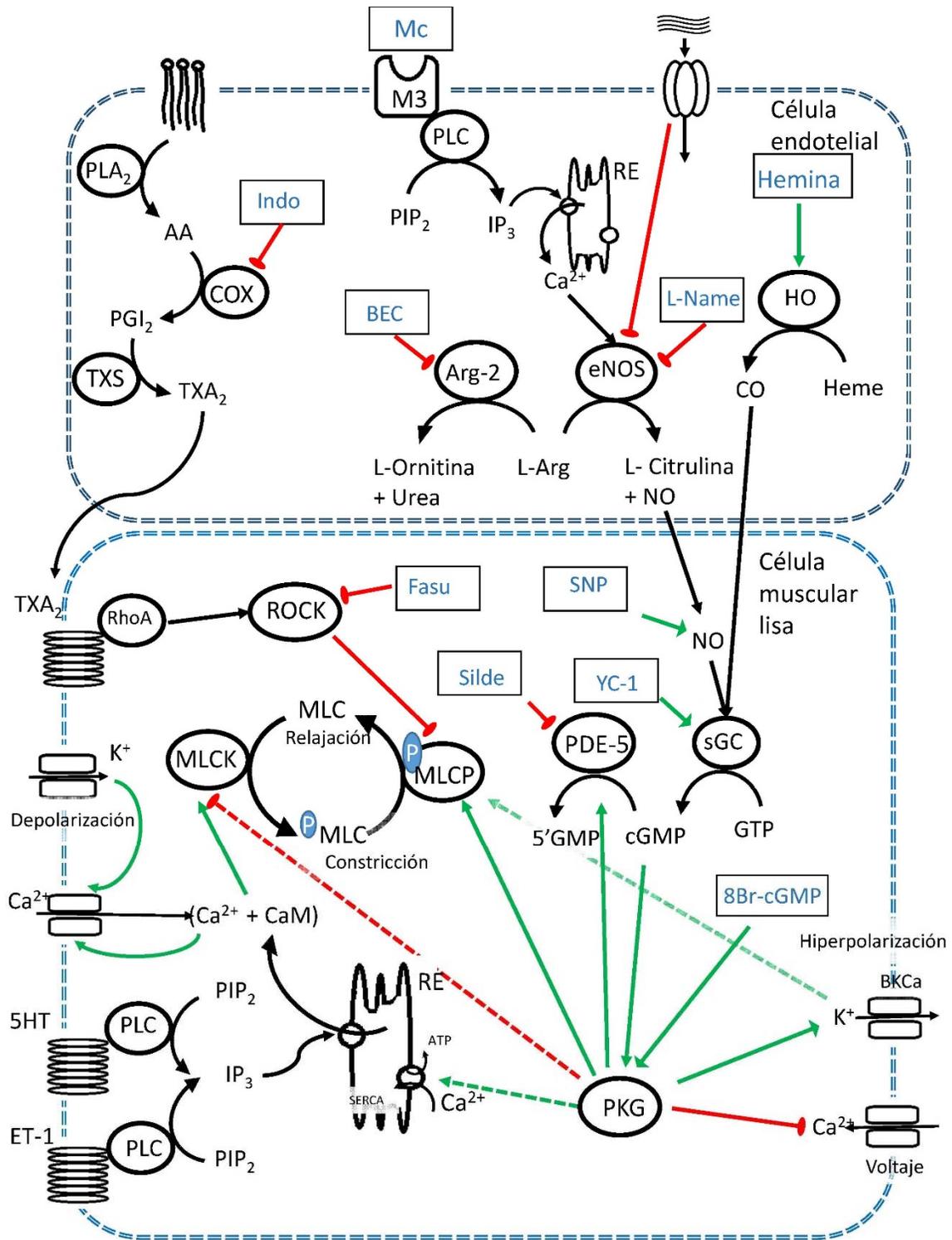


**Figura 32.** Evolución de la presión arterial pulmonar durante los días de tratamiento. Grupo de RN control (blanco; n=5) y RN tratados con hemina (negro; n=5).

Como se observó en esta memoria, la función de PKG se encuentra aumentada, debido al aumento del contenido disponible de cGMP. Sin embargo, estas respuestas vasodilatadoras finalmente no llevan a un cambio en la mPAP, por lo que podríamos inferir que el tono vascular basal no estaría regulado por un balance entre los niveles de agentes vasoactivos como se ha descrito desde el inicio

del estudio de la regulación de la circulación pulmonar (2,3,14,126). Es interesante entonces cuestionar al canon de regulación de la circulación pulmonar basal en el recién nacido, que propone que la regulación del tono vascular pulmonar basal, es un balance entre la acción de agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, y repensar la definición de esta, ya no en términos de balance de los agentes sino más bien como algo más estructural. En esta memoria, logramos aumentar o inclinar el equilibrio hacia la vasodilatación de una importante vía de señalización, como es la mediada por óxido nítrico y cGMP, sin observar mayores cambios en la mPAP, ni tampoco en la estructura de las arterias pulmonares. Lo que nos indicaría que la regulación local de la circulación pulmonar sería mediada por agentes vasoactivos, en condiciones de estrés o de respuestas agudas, como serían la exposición a hipoxia crónica, o a episodios agudos de hipoxia (86). Resultados de nuestro laboratorio apoyan esta línea de ideas, pues al administrar hemina en corderos hipertensos pulmonares hipóxicos, se logra la misma inducción de la vía mediada por NO y cGMP, y disminuyendo el remodelamiento arterial pulmonar, y finalmente disminuyendo la mPAP de esos corderos (81). Esta respuesta se observa en corderos gestados y mantenidos después del parto en condiciones de hipoxia crónica, que han sido caracterizados como neonatos hipertensos pulmonares (86) y con una hiperreactividad pulmonar frente a episodios agudos de hipoxia (86). Además, esta hiperreactividad también fue atenuada con la administración de hemina durante 10 días, lo que concordaría con nuestra idea, de que la regulación local de agentes vasoactivos, es más primordial en las respuestas frente a situaciones de estrés.

Finalmente, podemos concluir que esta memoria fue un aporte al área, pues abre la discusión sobre un tema que ha sido tratado no en profundidad, y dejado de lado por los grandes grupos que están dentro del estudio de la hipertensión pulmonar neonatal.



**Figura 33.** Diagrama de regulación propuesta de células endoteliales y musculares lisas de vasos arteriales pequeños de pulmón en recién nacidos de ovejas.

MC: metacolina; M3: receptor muscarínico del tipo 3; PLC: fosfolipasa c; PIP2: fosfatidilinositol bisfosfato; IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato; CA<sup>2+</sup>: calcio; RE: retículo endoplásmico; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; NO: óxido nítrico; L-Arg: l-arginina; Arg-2: arginasa 2; BEC: inhibidor arginasa; L-Name: inhibidor eNOS; HO: hemoxigenasa; Hemo: grupo hemo; CO: monóxido de carbono; PLA2: fosfolipasa A2; AA: ácido araquidónico; COX: prostaglandina-endoperóxido sintasa tipo 2; PGI2: prostaglandina I2; TXS: tromboxano sintasa; TXA2: tromboxano A2; Indo: indometacina, inhibidor Cox; RhoA: homólogo de la familia ras miembro A; ROCK: quinasa de la proteína Rhoa; Fasudil: inhibidor ROCK; SNP: nitroprusiato de sodio, dador de NO; YC-1: estimulador sGC; sGC: guanilil ciclasa soluble; GTP: guanosin trifosfato; cGMP: guanosin monofosfato cíclico; PDE-5: fosfodiesterasa tipo 5; 5'GMP: guanosin monofosfato; Silde: sildenafil, inhibidor PDE-5; PKG: proteína quinasa específica de cGMP; BKCa: Canales de potasio activados por calcio; SERCA: Ca/ATPasa del retículo sarco-endoplásmico; 5HT: serotonina; ET-1: endotelina; Cam: calmodulina; MLCK: quinasa de la cadena liviana de la miosina; MLCP: fosfatasa de la cadena liviana de la miosina; MLC: cadena liviana de la miosina; K<sup>+</sup>: potasio iónico.

## VI BIBLIOGRAFIA.

1. Vander AJ, Luciano D, Sherman J. Human physiology : the mechanisms of body function. 8th ed. Journal of Helminthology. Boston: McGraw-Hill; 2001. 800 p.
2. Gao Y, Cornfield DN, Stenmark KR, Thébaud B, Abman SH, Raj JU. Unique Aspects of the Developing Lung Circulation: Structural Development and Regulation of Vasomotor Tone. *Pulm Circ.* 2016;6(4):407–25.
3. Gao Y, Raj JU. Regulation of the Pulmonary Circulation in the Fetus and Newborn. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1291–335.
4. Hillman NH. Increasing pulmonary blood flow at birth: the nerve of the baby. *J Physiol.* 2017;595(5):1437–8.
5. Rudolph AM. Fetal and Neonatal Pulmonary Circulation. *Annu Rev Physiol.* 1979;41(1):383–95.
6. Haworth SG. Development of the normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Exp Physiol.* 1995;80(5):843–53.
7. Hooper SB, te Pas AB, Lang J, van Vonderen JJ, Roehr CC, Kluckow M, et al. Cardiovascular transition at birth: a physiological sequence. *Pediatr Res.* 2015;77(5):608–14.
8. Berghausen E, Freyhaus H, Rosenkranz S. Targeting of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension BT - (null). *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2013. p. 381–408.
9. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 2017;219(1):22–96.
10. Wojciak-Stothard B, Haworth SG. Perinatal changes in pulmonary vascular endothelial function. *PharmacolTher.* 2006;109:78–91.
11. Abman SH, Chatfield BA, Rodman DM, Hall SL, McMurtry IF. Maturational changes in endothelium-derived relaxing factor activity of ovine pulmonary arteries in vitro. *Am J Physiol.* 1991;260(4):L280-5.
12. Abman SH. Neonatal pulmonary hypertension: A physiologic approach to treatment. *Pediatr Pulmonol.* 2004;37(S26):127–8.
13. Cogolludo A, Moreno L, Villamor E. Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary arterial hypertension: Implications for vasodilator therapy. *Pharmacology.* 2007;79(2):65–75.
14. Flavahan NA. In *Development — A New Paradigm for Understanding Vascular Disease.* *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;69(5):248–63.
15. Chang F, Flavahan S, Flavahan NA. Immature endothelial cells initiate endothelin-mediated constriction of newborn arteries. *J Physiol.* 2016;594(17):4933–44.
16. Flavahan S, Flavahan NA. The atypical structure and function of newborn arterial endothelium is mediated by Rho/Rho kinase signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307(4):H628-32.
17. Suresh K, Shimoda LA. Lung Circulation. *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 897–943.
18. Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol.* 2013;591(Pt 9):2245–57.
19. Euler U, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand.* 1946;12(1937):301–20.
20. Sylvester JT, Shimoda L a, Aaronson PI, Ward JPT. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Physiol Rev.* 2012;92(1):367–520.
21. Baratchi S, Khoshmanesh K, Woodman OL, Potocnik S, Peter K, McIntyre P. Molecular Sensors of Blood Flow in Endothelial Cells. *Trends Mol Med.* 2017;23(9):850–68.
22. Zhou W, Dasgupta C, Negash S, Raj JU. Modulation of pulmonary vascular smooth muscle cell phenotype in hypoxia: role of cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(6):L1459-66.
23. Zhou J, Li Y-S, Chien S. Shear Stress-Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(10):2191–8.
24. Tolsa J-F, Gao Y, Sander FC, Souici A-C, Moessinger A, Raj JU. Differential responses of newborn pulmonary arteries and veins to atrial and C-type natriuretic peptides. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol. 2002;282(1):H273-80.
25. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27(1-4):201-6.
  26. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988. p. 411-5.
  27. Li M, Sun X, Li Z, Liu Y. Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5 suppresses serotonin signalling in pulmonary artery smooth muscles cells. *Pharmacol Res.* 2009;59(5):312-8.
  28. Kapakos G, Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Modulatory Role of Nitric Oxide/cGMP System in Endothelin-1-Induced Signaling Responses in Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6(4):247-54.
  29. Lévy M, Maurey C, Dinh-Xuan AT, Vouhé P, Israël-Biet D. Developmental Expression of Vasoactive and Growth Factors in Human Lung. Role in Pulmonary Vascular Resistance Adaptation at Birth. *Pediatr Res.* 2005;57(5):21R-25R.
  30. Nisell H, Hemsley A, Lunell N-O, Wolff K, Lundberg MJ. Maternal and Fetal Levels of a Novel Polypeptide, Endothelin: Evidence for Release during Pregnancy and Delivery. *Gynecol Obstet Invest.* 1990;30(3):129-32.
  31. Endo A, Shimada M, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, et al. Nitric Oxide and Endothelin 1 during Postnatal Life. *Neonatology.* 1996;70(1):15-20.
  32. Lévy M, Souil E, Sabry S, Favatier F, Vaugelade P, Mercier UC, et al. Maturation changes of endothelial vasoactive factors and pulmonary vascular tone at birth. *Eur Respir J.* 2000;15(1):158-65.
  33. Sweetman S. Martindale: The Complete Drug Reference. 36<sup>a</sup> ed. Sean C Sweetman, editor. London, UK: Pharmaceutical Press; 2009. 3709 p.
  34. Delaney C, Gien J, Grover TR, Roe G, Abman SH. Pulmonary vascular effects of serotonin and selective serotonin reuptake inhibitors in the late-gestation ovine fetus. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(6):L937-44.
  35. Kloza M, Baranowska-Kuczko M, Pędzisńska-Betiuk A, Jackowski K, Kozłowska H. [Serotonin hypothesis and pulmonary artery hypertension]. *Postępy Hig i Med doświadczalnej.* 2014;68(133):738-48.
  36. Delaney C, Gien J, Roe G, Isenberg N, Kailey J, Abman SH. Serotonin contributes to high pulmonary vascular tone in a sheep model of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;304(12):L894-901.
  37. Deng M, Deng L, Xue Y. MAP Kinase-Mediated and MLCK-Independent Phosphorylation of MLC20 in Smooth Muscle Cells. En: Sugi H, editor. *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans.* InTech; 2012. p. 93-112.
  38. Otto B, Steusloff A, Just I, Aktories K, Pfitzer G. Role of Rho proteins in carbachol-induced contractions in intact and permeabilized guinea-pig intestinal smooth muscle. *J Physiol.* 1996;496(2):317-29.
  39. Lopez NC, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes R V, Calaf G, Cabello G, et al. Role of the RhoA/ROCK pathway in high-altitude associated neonatal pulmonary hypertension in lambs. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2016;310(11):R1053-63.
  40. Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J.* 2005;389(Pt 3):763-74.
  41. Kawka DW, Ouellet M, Héту P, Singer II, Riendeau D. Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771:45-54.
  42. Postolow F, Fediuk J, Nolette N, Hinton M, Dakshinamurti S. Thromboxane promotes smooth muscle phenotype commitment but not remodeling of hypoxic neonatal pulmonary artery. *Fibrogenesis Tissue Repair. Fibrogenesis & Tissue Repair;* 2015;8(1):20.
  43. Shaul PW, Pace MC, Chen Z, Brannon TS. Developmental changes in prostacyclin synthesis are conserved in cultured pulmonary endothelium and vascular smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(1):113-21.

44. Moncada S, Palmer RM, Higgs E a. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. 1988;12(4):365–72.
45. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(4):361–74.
46. Epstein FH, Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002–12.
47. Krause BJ, Prieto CP, Muñoz-Urrutia E, San Martín S, Sobrevia L, Casanello P. Role of arginase-2 and eNOS in the differential vascular reactivity and hypoxia-induced endothelial response in umbilical arteries and veins. *Placenta*. Elsevier Ltd; 2012;33(5):360–6.
48. Daff S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide - Biol Chem*. Elsevier Inc.; 2010;23(1):1–11.
49. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990;101(3):746–52.
50. Derbyshire ER, Marletta M a. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu Rev Biochem*. 2012;81(1):533–59.
51. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46(1):235–76.
52. Derbyshire ER, Marletta MA. Biochemistry of Soluble Guanylate Cyclase. cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 17–31.
53. Ahluwalia A, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Vascular actions of natriuretic peptides - Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Res Cardiol*. 2004;99:83–9.
54. Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(1–2):80–91.
55. Buys E, Sips P. New insights into the role of soluble guanylate cyclase in blood pressure regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(2):135–42.
56. Lucas K a, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):375–414.
57. Hoffmann L, Schmidt P, Keim Y, Schaefer S, Schmidt H, Stasch J. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*. 2009;157(5):781–95.
58. Raat NJH, Tabima DM, Specht PAC, Tejero JJJ, Champion HC, Kim-Shapiro DB, et al. Direct sGC Activation Bypasses NO Scavenging Reactions of Intravascular Free Oxy-Hemoglobin and Limits Vasoconstriction. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(18):2232–43.
59. Follmann M, Griebenow N, Hahn MG, Hartung I, Mais F-J, Mittendorf J, et al. The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. *Angew Chemie Int Ed*. 2013;52(36):9442–62.
60. Stasch J-P, Pacher P, Evgenov O V. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation*. 2011;123(20):2263–73.
61. Evgenov O V. Soluble Guanylate Cyclase Activator Reverses Acute Pulmonary Hypertension and Augments the Pulmonary Vasodilator Response to Inhaled Nitric Oxide in Awake Lambs. *Circulation*. 2004;110(15):2253–9.
62. Moreno L, Gonzalez-Luis G, Cogolludo A, Lodi F, Lopez-Farre A, Tamargo J, et al. Soluble guanylyl cyclase during postnatal porcine pulmonary maturation. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2005;288(1):L125–30.
63. Moreno L, Losada B, Cogolludo AL, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, et al. Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: Activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediatr Res*. 2004;56(4):563–70.
64. Lasker GF, Pankey E a, Kadowitz PJ. Modulation of Soluble Guanylate Cyclase for the Treatment of Erectile Dysfunction. *Physiology*. 2013;28(4):262–9.
65. Corbin JD, Turko I V, Beasley A, Francis SH. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide- dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP- binding activities. *Eur J Biochem*. 2000;267(9):2760–7.
66. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced

- downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106(1):57–62.
67. Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Reactive oxygen species mediate RhoA / Rho kinase-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2008;1:515–29.
  68. Parker TA, Roe G, Grover TR, Abman SH. Rho kinase activation maintains high pulmonary vascular resistance in the ovine fetal lung. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):L976–82.
  69. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Postnatal maturational shift from PKC $\zeta$  and voltage-gated K<sup>+</sup> channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res*. 2005;66(1):84–93.
  70. Ndisang JF, Tabien HEN, Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens*. 2004;22(6):1057–74.
  71. Herrera EA, Reyes R V, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, et al. Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc Res*. 2008;77(1):197–201.
  72. Prawan A, Kundu JK, Surh Y-J. Molecular Basis of Heme Oxygenase-1 Induction: Implications for Chemoprevention and Chemoprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11–12):1688–703.
  73. Ndisang JF, Wang R. Alterations in heme oxygenase/carbon monoxide system in pulmonary arteries in hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(5):557–63.
  74. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev*. 2006;86(2):583–650.
  75. Ryter SW, Choi AMK. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res*. Elsevier Inc.; 2016;167(1):7–34.
  76. Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach C a, Pimstone NR, et al. Recommendations for the Diagnosis and Treatment of the Acute Porphyrrias. *Ann Intern Med*. 2005;142(6):439.
  77. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 2006;111(2):327–45.
  78. Paoli M, Marles-Wright J, Smith A. Structure–Function Relationships in Heme-Proteins. *DNA Cell Biol*. 2002;21(4):271–80.
  79. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem*. 2000;82:33–41.
  80. Shimizu T, Huang D, Yan F, Stranova M, Bartosova M, Fojtíková V, et al. Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem Rev*. 2015;115(13):6491–533.
  81. Ebensperger G. Rol del sistema hemoxigenasa-monóxido de carbono en la regulación del tono y el remodelamiento vascular pulmonar del recién nacido de oveja crónicamente hipóxico. Universidad de Chile; 2011.
  82. Ndisang JF. Induction of heme oxygenase-1 and stimulation of cGMP production by hemin in aortic tissues from hypertensive rats. *Blood*. 2003;101(10):3893–900.
  83. Riquelme A. Disminución de la proliferación de músculo liso de la arteria pulmonar en ovejas recién nacidas en tierras altas por administración de hemina. Universidad de Tarapacá; 2013.
  84. Llanos AJ, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes RV, Pulgar VM, Serón-Ferré M, et al. Fetal and postnatal pulmonary circulation in the Alto Andino. *Placenta*. Elsevier Ltd; 2011;32:S100–3.
  85. Li Z, Wang Y, Man RYK, Vanhoutte PM. Upregulation of heme oxygenase-1 potentiates EDH-type relaxations in the mesenteric artery of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2013;305(10):H1471–83.
  86. Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, Sanhueza EM, Reyes R V, Ebensperger G, et al. High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2007;292(6):R2234–40.
  87. Burch WM, Russell S, Leonard R. *The principles of humane experimental technique*. 1st ed. Michigan: Methuen & Co; 1959. 238 p.

88. Berson BSA, Yalow RS, Bauman A, Rothschild A, Newerly K. Insulin-I131 Metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest.* 1955;35(2):170–90.
89. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971;15(3):232–6.
90. Porter JP. Contribution of central ANG II to acute stress-induced changes in baroreflex function in young rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):1386–91.
91. Villamor E, Ruijtenbeek K, Pulgar V, Mey JOGRDE, Blanco CE, Pul- V, et al. Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R917–27.
92. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19–26.
93. Herrera EA, Verkerk MM, Derks JB, Giussani DA. Antioxidant Treatment Alters Peripheral Vascular Dysfunction Induced by Postnatal Glucocorticoid Therapy in Rats. Federici M, editor. *PLoS One.* 2010;5(2):e9250.
94. Neubig RR. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):597–606.
95. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581–5.
96. Torres F, Gonzalez-candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Seron-Ferre M, et al. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res.* 2015;58(3):362-373.
97. Glantz S, Slinker B, Neilands T. *Primer of Applied Regression & Analysis of Variance.* 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Education; 2016. 1216 p.
98. Behringer EJ. Calcium and electrical signaling in arterial endothelial tubes: New insights into cellular physiology and cardiovascular function. *Microcirculation.* 2017;24(3):1–12.
99. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol.* 2017;7(2):485–581.
100. Hughes AD. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Vasc Res.* 1995;32(6):353–70.
101. Wong A, Zhang YW, Jeschke GR, Turk BE, Rudnick G. Cyclic GMP-dependent stimulation of serotonin transport does not involve direct transporter phosphorylation by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36051–8.
102. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300(6):R1288–95.
103. Bassil M, Anand-Srivastava MB. Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(7):1162–73.
104. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Panza J a. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension.* 2000;35:1237–41.
105. Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Endothelium-derived reactive oxygen species and endothelin-1 attenuate NO-dependent pulmonary vasodilation following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(4):L801-8.
106. Ma X, Sayed N, Beuve A, van den Akker F. NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism. *EMBO J.* 2007;26(2):578–88.
107. Stone JR, Marietta MA. Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. *Biochemistry.* 1994;33(18):5636–40.
108. Reynolds MF, Parks RB, Burstyn JN, Shelver D, Thorsteinsson M V., Kerby RL, et al. Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CooA, a CO-sensing transcription activator from *R. rubrum*, reveals a five-coordinate NO-heme. *Biochemistry.* 2000;39(2):388–96.

109. Friebe a, Koesling D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1998;53(1):123–7.
110. Hsu HK, Juan SH, Ho PY, Liang YC, Lin CH, Teng CM, et al. YC-1 inhibits proliferation of human vascular endothelial cells through a cyclic GMP-independent pathway. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(2):263–71.
111. Chang MS, Lee W Sen, Teng CM, Lee HM, Sheu JR, Hsiao G, et al. YC-1 increases cyclooxygenase-2 expression through protein kinase G- and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in A549 cells. *Br J Pharmacol.* 2002;136(4):558–67.
112. McAllister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Kadlecěk a, Seger D, Trong HL, Colbran JL, et al. The structure of a bovine ling cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J Biol Chem.* 1993;268(22863–22873):22863–73.
113. Thomas MK, Francis SH, Corbin JD. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem.* 1990;265(25):14971–8.
114. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Fei R, Hofmann F, Beavo JA. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3310–7.
115. Aziz MTA, Mostafa T, Atta H, Rashed L, Marzouk SA, Obaia EM, et al. The role of PDE5 inhibitors in heme oxygenase-cgmp relationship in rat cavernous tissues. *J Sex Med.* 2008;5(7):1636–45.
116. Lin CS, Lin G, Xin ZC, Lue TF. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Curr Pharm Des.* 2006;12(27):3439–57.
117. Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Pulmonary PKG-1 is upregulated following chronic hypoxia. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2003;285(3):L634–42.
118. Butler T, Paul J, Europe-Finner N, Smith R, Chan E-C. Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2013;304(6):C485–504.
119. Etter EF, Eto M, Wardle RL, Brautigan DL, Murphy RA. Activation of Myosin Light Chain Phosphatase in Intact Arterial Smooth Muscle during Nitric Oxide-induced Relaxation. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34681–5.
120. Barman S a, Zhu S, Han G, White RE. cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(6):L1004–11.
121. Vang A, Mazer J, Casserly B, Choudhary G. Activation of endothelial BKCa channels causes pulmonary vasodilation. *Vascul Pharmacol.* 2010;53(3–4):122–9.
122. Ishii T, Sunami O, Saitoh N, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase by nitric oxide. *FEBS Lett.* 1998;440(1–2):218–22.
123. Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, et al. Regulation of Cloned Cardiac L-type Calcium Channels by cGMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6135–43.
124. Zhang Q, Scholz PM, He Y, Tse J, Weiss HR. Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction. *Cell Calcium.* 2005;37(3):259–66.
125. Zhou Z, Sayed N, Pyriochou A, Roussos C, Fulton D, Beuve A, et al. Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(10):1803–10.
126. Gluckman P, Sizonenko S, Bassett N. The transition from fetus to neonate—an endocrine perspective. *Acta Paediatr Suppl.* 1999;428:7–11.