

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



**EFFECTO DE MELATONINA, HEMINA Y SILDENAFIL
COMO TERAPIA VASODILATADORA, ANTIOXIDANTE Y
ANTIREMODELANTE VASCULAR EN ARTERIAS
CEREBRALES MEDIAS DE CORDEROS GESTADOS EN
HIPOXIA CRÓNICA**

ANTONIO ACUÑA PINEDA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Emilio Herrera Videla

2020

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 4 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| ABREVIATURAS | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| Hipoxia perinatal | 8 |
| Estrés oxidativo perinatal | 9 |
| Antioxidantes en el período perinatal..... | 11 |
| Antiremodelantes en el período perinatal | 13 |
| Vasodilatadores en el período perinatal | 15 |
| HIPÓTESIS..... | 17 |
| OBJETIVOS | 18 |
| Objetivo general..... | 18 |
| Objetivos específicos | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 19 |
| Animales | 19 |
| Función vascular ex vivo - Miografía de alambre..... | 20 |
| Características morfoestructurales - Histología | 21 |
| Estrés oxidativo y expresión de proteínas - Inmunohistoquímica..... | 21 |
| Expresión de resultados y análisis estadístico | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| Función vasoconstrictora de las ACM | 23 |
| Función vasodilatadora de las ACM | 24 |
| Morfología e inmunohistoquímica de las ACM | 25 |
| DISCUSIÓN | 28 |
| CONCLUSIÓN | 38 |
| ANEXO | 39 |
| REFERENCIAS | 41 |

RESUMEN

La hipoxia crónica durante la gestación es una condición crítica que deriva en estrés oxidativo y disfunción cerebrovascular en el neonato, pudiendo tener repercusiones en la vida adulta. Debido a que la hipoxia y el estrés oxidativo son los principales inductores de la disfunción y remodelamiento vascular, se ha propuesto utilizar la administración terapéutica de melatonina (M) como vasodilatador y antioxidante, de hemina (H) como vasodilatador y antiproliferativo, y de sildenafil (S) como vasodilatador para revertir esta disfunción. En este estudio se pretende evaluar los efectos que estos fármacos tendrían a nivel de la vasculatura cerebral.

La hipótesis de esta Tesis es que el tratamiento neonatal con MHS mejora la función vasodilatadora y disminuye el remodelamiento vascular y el estrés oxidativo cerebral inducido por la hipoxia crónica.

El objetivo fue determinar los efectos de M, H y S sobre la función, estructura y estrés oxidativo, de las arterias cerebrales medias de corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica.

Se desarrollaron 5 grupos experimentales de corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a una altitud de 3.600 metros con los siguientes tratamientos: vehículo o control (CN), melatonina (M), hemina (H), sildenafil (S) y el tratamiento combinado (MHS). Una vez terminado los tratamientos, los animales se mantuvieron por al menos 1 semana para luego extraer las arterias cerebrales medias (ACM) y evaluar su función vasoconstrictora en respuesta a cloruro de potasio (KCl), serotonina (5Ht), tromboxano (TX) y endotelina (ET), y vasodilatadora en respuesta a metacolina (MetCh) y nitroprusiato de sodio (SNP), mediante miografía de alambre. A la vez, estas muestras fueron sometidas a un análisis morfoestructural mediante histología e inmunohistoquímica con marcadores de remodelamiento, proliferación y estrés oxidativo.

Se observó un aumento de la respuesta contráctil a K^+ , 5Ht y TX, de las ACM tratadas con hemina. Por otro lado, M, H y S presentaron una mayor respuesta vasodilatadora a MetCh. No se encontraron diferencias respecto al análisis morfoestructural ni inmunohistoquímico para remodelamiento y proliferación, mientras se observó un aumento del marcador de estrés oxidativo 4HNE en el grupo S. En general, los tratamientos presentaron un efecto vasodilatador ex vivo sin demostrar otros efectos importantes sobre las ACM, al menos 1-3 semanas después de finalizados.

En conclusión, las terapias evaluadas tienen efectos vasodilatadores en ACM de neonatos hipóxicos crónicos, evidenciando una protección endotelial de estas arterias.

ABSTRACT

Chronic hypoxia during pregnancy is a critical condition that leads to oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in the neonate, which can have repercussions in adult life. Since hypoxia and oxidative stress are the main inducers of vascular dysfunction and remodeling, it has been proposed to use the therapeutic administration of melatonin (M) as a vasodilator and antioxidant, of hemin (H) as a vasodilator and antiproliferative, and of sildenafil (S) as a vasodilator to reverse this dysfunction. This study aims to evaluate the effects that these drugs would have on the cerebral vasculature.

In this Thesis, we hypothesised that a neonatal treatment with MHS improves vasodilator function and decreases vascular remodeling and brain oxidative stress induced by chronic hypoxia.

The objective was to determine the effects of M, H and S on the function, structure and oxidative stress of the middle cerebral arteries of lambs gestated and born in chronic hypoxia.

We used 5 experimental groups of lambs gestated and born in chronic hypoxia at 3,600 meters with the following treatments: vehicle or control (CN), melatonin (M), hemin (H), sildenafil (S) and the combined treatment (MHS). Once the treatments were finished, the animals were kept for at least 1 week to then extract the middle cerebral arteries (MCA) and evaluate their vasoconstrictor response to potassium chloride (KCl), serotonin (5Ht), thromboxane (TX) and endothelin (ET), and vasodilator response to methacholine (MetCh) and sodium nitroprusside (SNP), in a wire myograph. At the same time, these samples were subjected to a morphostructural analysis by histology and immunohistochemistry with markers of remodeling, proliferation and oxidative stress.

We observed an increase in contraction in response to K⁺, 5Ht and TX, of the MCA treated with hemin. On the other hand, M, H and S presented a greater vasodilator response to MetCh. No differences were found in the morphostructural or immunohistochemical analysis for remodeling and proliferation, while for oxidative stress marker, 4HNE was increased in S. The treatments have an ex vivo vasodilatory effect without demonstrating other important effects on MCAs, at least 1-3 weeks after the end of the treatments.

In conclusion, the treatments have vasodilator effects on MCA from chronic hypoxic neonates, showing an endothelial protection of these arteries.

ABREVIATURAS

ACM: Arterias cerebrales medias
ADMA: Dimetilarginina asimétrica
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
BH2: Dihidrobiopterina
BH4: Tetrahidrobiopterina
BKCa: Canales de potasio activados por calcio
CAT: Catalasa
CN: Grupo control
CO: Monóxido de carbono
COX: Ciclooxygenasa
EDHF: Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
ERO: Especies reactivas de oxígeno
ET-1: Endotelina 1
GCs: Guanilato ciclasa soluble
GMPc: Guanosín monofostato cíclico
GSH: Glutati3n
GSHPx: Glutati3n peroxidasa
GTP: Guanosín trifosfato
H: Grupo hemina
HAPN: Hipertensi3n arterial pulmonar neonatal
HE: Hematoxilina - Eosina
HIF-1: Factor inducible por hipoxia
HO: Hemooxygenasa

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno
iNOS: 3xido n3trico sintasa inducible
LPX: Lipooxygenasa
M: Grupo melatonina
MetCh: Metacolina
MHS: Grupo triterapia
MT1: Receptor de melatonina tipo 1
MT2: Receptor de melatonina tipo 2
NADPH: Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato
NO: 3xido n3trico
NOS: 3xido n3trico sintasa
OH•: Radical hidroxilo
ONOO•: Peroxinitrito
O₂: Ox3geno molecular
•O₂•: An3n super3xido
PDE5: Fosfodiesterasa tipo 5
PKG: Prote3na quinasa G
REDOX: Reacciones de 3xido - reducci3n
S: Grupo sildenafil
SNP: Nitroprusiato de sodio
SOD: Super3xido dismutasa
TX: Tromboxano
U46619: Mim3tico de tromboxano
VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
5Ht: Serotonina

INTRODUCCIÓN

La hipoxia es la disminución en el aporte de oxígeno según las demandas fisiológicas de un tejido u órgano. Esta condición suele ocurrir en circunstancias como la exposición a una presión atmosférica disminuida (>2,500 metros de altura), intoxicación por monóxido de carbono (CO), anemia grave, insuficiencia pulmonar o isquemia tisular, entre otras (Cao, 2015; Frosch et al., 2015; Sanchez et al., 2016; Couto and Nelson, 2010).

Hipoxia perinatal

La hipoxia perinatal es uno de los principales desafíos durante la vida fetal y neonatal temprana. Se puede presentar como hipoxia aguda, en cortos periodos que duran algunos minutos asociados al trabajo de parto, contracciones uterinas y compresiones del cordón umbilical; o como hipoxia crónica, en periodos que pueden durar varias semanas o incluso meses (Giussani, 2016). Su adecuado manejo es fundamental pues es de las mayores causas de morbimortalidad perinatal (Pearce, 2006). A la fecha, aún no existe un método terapéutico que termine o disminuya de manera efectiva las complicaciones de este cuadro. Además, si la hipoxia es muy severa o prolongada durante la gestación, podría dejar al cerebro susceptible a encefalopatía hipóxica-isquémica, además de generar una programación fetal, teniendo efectos a corto y largo plazo que derivan finalmente en problemas en la vida adulta (Li et al., 2012). Parte de estos efectos podrían impactar a nivel cardíaco, cerebrovascular y endocrino (Longo & Pearce, 2005), generando deficiencias cognitivas, epilepsia, parálisis cerebral e incluso la muerte (Gunn et al., 2009; Li et al., 2012; Low et al., 1985; Gunn & Bennet, 2009).

La respuesta vascular a la hipoxia crónica en el cerebro perinatal es única y compleja (Bennet et al., 2012; Baburamani et al., 2013). El encéfalo inmaduro es particularmente sensible a la hipoxia y susceptible al daño oxidativo debido a la alta demanda de oxígeno en comparación con otros tejidos o el cerebro de un adulto, y por la alta concentración de lípidos con ácidos grasos poliinsaturados que incrementan el riesgo de peroxidación (Miller et al., 2012). Además, los neonatos tienen un mayor consumo de O₂ (> tasa metabólica), menores niveles plasmáticos de antioxidantes como glutatión peroxidasa (GSHPx), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), beta-carotenos y vitamina E entre otros (Bracci & Buonocore, 1998; Gopinathan et al., 1994). A esto se le agrega una disminuída actividad enzimática antioxidante (Aversa et al., 2012; Saugstad, 2005), lo cual se agrava más en altura (Herrera et al., 2015). De hecho, a gran altitud, la hipoxia modula las señales adrenérgicas y serotoninérgicas en la vasculatura cerebral (Gilbert et al., 2003), disminuyendo la relajación dependiente de endotelio (Williams & Pearce 2006).

Después del nacimiento, los periodos de disminución en el aporte de oxígeno desencadenan una respuesta tanto en el sistema respiratorio como cardiovascular que rápidamente reestablecen la oxigenación sanguínea para permitir la perfusión y oxigenación de todos los órganos y tejidos del individuo (Barret et al., 2016c). Sin embargo, dentro del útero, el aporte de oxígeno es considerablemente menor y está limitado por la placenta, por lo que el feto cuenta con una serie de adaptaciones que aseguran que el aporte de oxígeno supere las demandas metabólicas (Giussani, 2016). Es así como, en respuesta a hipoxia aguda se produce una marcada bradicardia (Boddy et al., 1974; Giussani, 2016; Michaeli et al., 2020) y una intensa vasoconstricción periférica, además de una disminución de los movimientos fetales (Giussani et al., 1995; Michaeli et al., 2020). Lo anterior disminuye el consumo de oxígeno (Rurak & Gruber, 1983), sin alterar el débito cardíaco y la perfusión central (Anderson et al., 1986). La redistribución del flujo sanguíneo desde los tejidos y órganos menos esenciales, como los del tracto digestivo y extremidades inferiores, a los más esenciales como encéfalo, miocardio y adrenales, es fundamental en mantener la viabilidad fetal en hipoxia aguda (Jensen et al., 1999). La bradicardia y la vasoconstricción periférica es desencadenada por un quimiorreflejo carotideo (Giussani et al., 1993), mientras que la vasoconstricción de los órganos periféricos se produce por catecolaminas liberadas desde las adrenales (Fletcher et al., 2006), por aumento del tono simpático local (Cohen et al., 1982) y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Thakor et al., 2015; Kane et al., 2014). Por otro lado, la vasodilatación del territorio cerebral se produce por óxido nítrico (NO), adenosina y prostanoïdes (Hunter et al., 2003; Blood et al., 2003; Nishida et al., 2006).

En contraste con el gran conocimiento de los efectos de la hipoxia aguda, la respuesta cerebrovascular frente a la hipoxia crónica durante la gestación ha sido difícil de dilucidar. La evidencia actual indica que la respuesta se mantiene de manera similar a la hipoxia aguda, continuando la redistribución con vasoconstricción periférica y vasodilatación encefálica (Giussani, 2016; Allison et al., 2016; Herrera et al., 2016). La persistente redistribución del aporte sanguíneo asegura la llegada de oxígeno y nutrientes al encéfalo en desmedro de los órganos periféricos, lo que produce alteraciones, como por ejemplo, crecimiento asimétrico, con un menor tamaño del cuerpo y una cabeza de tamaño relativamente normal (Giussani et al., 2007; Soria et al., 2013; Herrera et al., 2016), presentándose además menor desarrollo de órganos como riñones y páncreas (Dorey et al., 2014; Limesand et al., 2005). Sin embargo, pareciera que la respuesta hemodinámica fetal disminuye a medida que la hipoxia se extiende en el tiempo (Herrera et al., 2016), presentando una vasodilatación cerebral menor. Además, la vasoconstricción periférica persistente produce remodelamiento cardíaco debido al aumento de la poscarga (Salinas et al., 2010). En esta respuesta hemodinámica a hipoxia crónica

también participa el aumento de ERO (Allison et al., 2016; Herrera et al., 2010; Herrera et al., 2014a).

Además del problema intrínseco de la falta de oxígeno, diversos estudios han demostrado que la hipoxia crónica en la etapa perinatal es capaz de generar estrés oxidativo (Herrera et al., 2014; Farias et al., 2016) debido al aumento de ERO por una incompleta reducción del oxígeno (Clanton, 2007; Sylvester et al., 2012).

Estrés oxidativo perinatal

El estrés oxidativo ocurre por el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la habilidad endógena de detoxificar los intermediarios reactivos, donde las ERO superan la capacidad antioxidante (Giussani et al., 2012; Sylvester et al., 2012; Villamor et al., 2019). Por otro lado, el estrés reductivo, se podría producir por la disminución excesiva de ERO debido también a un desbalance en las reacciones de oxidación-reducción (REDOX), que deriva en disminución del metabolismo y respuesta al crecimiento celular y función mitocondrial (Pérez et al., 2017). El equilibrio entre las reacciones de oxidación-reducción es indispensable para mantener la homeostasis celular. De hecho, pequeñas cantidades de ERO son necesarias para el normal funcionamiento y diferenciación de tejidos, actuando como importantes moléculas de señalización celular (Herrera et al., 2014a; Pérez et al., 2017).

Los radicales libres son átomos o moléculas altamente reactivas e inestables debido a que presentan un electrón desapareado en su orbital más externo (Floyd, 1990; Valdez et al., 2000). Reaccionan rápidamente con otras moléculas cercanas para capturar el electrón que les falta para lograr su estabilidad, transformándola en un radical libre también (Buonocore & Groenendaal, 2007). Los radicales libres que contienen oxígeno se denominan ERO. Las ERO más importantes son el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) y las especies tóxicas no radicalarias peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). De estos, el primero en formarse, es el $\bullet\text{O}_2^-$, cuando el oxígeno adquiere un electrón adicional, dando luego origen a los ERO secundarios H_2O_2 y $\text{OH}\bullet$ (Miller et al., 2012). El H_2O_2 puede reaccionar con el Fe^{+2} mitocondrial formando $\text{OH}\bullet$ mediante la reacción de Fenton (Sutton & Winterbourn, 1989). Además, el NO producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) está también implicado en el daño celular por radicales libres. El NO es un radical libre débil que no reacciona con la mayoría de las moléculas biológicas, pero que al combinarse con $\bullet\text{O}_2^-$ se transforma en peroxinitrito (ONOO^-), una especie reactiva de nitrógeno que produce peroxidación lipídica (Rodrigo et al., 2005).

Entre las fuentes enzimáticas que producen ERO en mamíferos se encuentran la cadena transportadora de electrones, NADPH oxidasa, el sistema citocromo P450 monooxidasa, xantina oxidasa, NOS, ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LPX) (Apel & Hirt, 2004; Dowling & Simmons, 2009). En el sistema vascular, las principales fuentes de anión superóxido son la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) desacoplada y la mitocondria (Katusic, 1996; Förstermann & Sessa, 2012). ERO tienen efectos directos sobre las células musculares lisas y fibroblastos, en proteínas, lípidos e hidratos de carbono, lo que altera las membranas celulares, desactiva algunas enzimas y daña los ácidos nucleicos que conforman el ADN y ARN. Tanto el estrés oxidativo como la hipoxia inducen cambios funcionales y estructurales en el sistema cardiovascular (Torres et al., 2015; Herrera et al., 2007).

Parte de los efectos patológicos del estrés oxidativo es la disfunción endotelial, en gran medida por la alteración de componentes vasodilatadores como el NO endotelial. En condiciones de estrés oxidativo, la unión de NO con $\bullet\text{O}_2^-$ impide que cumpla su función biológica vasodilatadora, siendo este mecanismo el más importante de la disfunción endotelial (Lara, 2014).

La eNOS es una flavoenzima dependiente de calcio que oxida L-arginina a NO y L-citrulina vía reducción del O_2 y que puede actuar como un generador de ERO dependiendo de la disponibilidad de cofactores y sustratos (Andresen et al., 2006a). Los niveles intracelulares de calcio controlan la asociación eNOS-calmodulina que es un paso importante en la activación de eNOS. Una proteína que participa en la activación del eNOS es la heat shock protein 90 (HSP90), una chaperona que incrementa la actividad de eNOS. El proceso de producción de NO también requiere del cofactor de NOS, tetrahidrobiopterina (BH4) que juega un rol crucial acoplando la reducción del oxígeno a la oxidación de la L-arginina y manteniendo la estabilidad de los dímeros de NOS. ERO puede desacoplar eNOS debido a la oxidación de BH4 a dihidrobiopterina (BH2) (Tabina et al., 2012). Si la producción o la eficiencia de BH4 disminuye o hay una deficiencia en el sustrato de NOS L-arginina, entonces NOS estará desacoplada resultando en la producción de anión peróxido en lugar de NO (Herrera et al., 2014a). Tanto $\bullet\text{O}_2^-$ como ONOO- pueden reaccionar con BH4 disminuyendo su disponibilidad, además de inhibir guanilato ciclasa soluble (GCs) (Munzel et al., 2005; Tabima et al., 2012). El NO producido por la célula endotelial difunde a la célula muscular lisa, uniéndose a la enzima citosólica GCs y permitiendo que esta catalice de GTP a GMPc. GCs es una proteína heterodímera formada por una subunidad α y una β . La subunidad α contiene el sitio de unión a NO y la subunidad β cataliza la formación de GMPc (Breitenstein et al., 2016). El aumento del tono oxidativo favorece la oxidación de GCs e incrementa el inhibidor de la eNOS dimetilarginina asimétrica (ADMA),

disminuyendo la función vasodilatadora (Lüneburg et al., 2016). Todas las condiciones antes descritas pueden verse aumentadas por hipoxia crónica y estrés oxidativo, derivando en disfunción endotelial.

El remodelamiento vascular es un cambio morfoestructural activo, inducido por hipoxia y estrés oxidativo, entre otros (Matlung et al., 2009). En este proceso se ven involucradas tanto las células endoteliales como las musculares lisas, con crecimiento, migración y muerte celular, además de cambios en la matriz extracelular, asociándose a un engrosamiento de la capa media, disfunción endotelial y rigidización de las arterias (Kumar et al., 2015).

La hipoxia y sobreproducción de ERO activa factores remodelantes como el factor inducible por la hipoxia 1 (HIF-1) que es un factor de transcripción y uno de los principales reguladores de la homeostasis del oxígeno (Semenza & Wang, 1992). HIF es capaz de transcribir más de 100 genes involucrados en la función vascular que inducen vasoconstricción, angiogénesis y proliferación celular (Herrera et al., 2014a; Lara, 2014) tales como COX-2, endotelina-1 (ET-1), hemooxigenasa-1 (HO-1), NOS inducible (iNOS) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Semenza, 2006; Semenza & Wang, 1992). Además, ERO puede interferir con la regulación de las prolil hidroxilasas, moléculas reguladoras de HIF que inician su proceso de degradación (Pouysségur & Mechta-Grigoriou, 2006).

Como gran parte de los efectos vasculares inducidos por hipoxia se asocian también a estrés oxidativo, se ha propuesto la administración de antioxidantes.

Antioxidantes en el período perinatal

Los antioxidantes corresponden a moléculas que disminuyen el daño por estrés oxidativo neutralizando ERO, bloqueando y/o inactivando la formación de radicales libres (Porth, 2015). Estos pueden ser enzimáticos como la SOD, GSHPx y CAT. La SOD transforma el anión superóxido en H_2O_2 , que luego es dissociado por CAT o GSHPx a H_2O y O_2 (Miller et al., 2012). Entre los no enzimáticos se encuentran las vitaminas A, C y E, betacarotenos, ácido lipoico, glutatión (GSH) y ubiquinonas (Buonocore & Groenendaal, 2007). Entre los endógenos se encuentra la melatonina, ácido lipoico y los enzimáticos, mientras que entre los exógenos están las vitaminas A, C y E, además de minerales como cobre, manganeso, selenio y zinc (Miller et al., 2012).

Melatonina es una hormona producida por la glándula pineal que tiene funciones reguladoras de los ritmos circadianos, actuando como principal señal circadiana (Pawlina, 2016; Guyton & Hall, 2006; Barret et al., 2016a). Además de

su función neuroendocrina, melatonina ha demostrado tener propiedades antioxidantes y vasodilatadoras en la circulación cerebral en neonatos sometidos a hipoxia crónica (Herrera et al., 2014b). A la vez, melatonina es capaz de reducir el estrés oxidativo y mejorar la función vascular de arterias pulmonares pequeñas en corderos hipóxicos (Torres et al., 2015). Las características de melatonina como antioxidante incluyen una acción directa neutralizando ERO, y acciones indirectas mediante la activación de enzimas antioxidantes como SOD, GSHPx, GSHreductasa, CAT y peroxidasas, además de la capacidad de modular negativamente la producción de ERO por enzimas pro-oxidantes como lipooxigenasas (LPX) (Tan et al., 2003; Reiter et al., 2003). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que melatonina es capaz de modular negativamente la generación de $\bullet\text{O}_2^-$ en la mitocondria y la NADPH oxidasa (González-Candia et al., 2018). Adicionalmente, melatonina es considerada como un agente vasodilatador leve (Weekley, 1993; Das et al., 2008; Torres et al., 2015; Herrera & González-Candia, 2020) (Figura 1). Algunos estudios indican que los efectos vasodilatadores de melatonina serían dependientes de receptores MT1 Y MT2 (Pandi-Perumal et al., 2006; Zawilska et al., 2009) mientras que otros estudios indican que estos serían independientes de receptores, pudiendo estar relacionados con mecanismos inhibidores simpáticos (Torres-Farfan et al., 2008). Así, se ha demostrado que melatonina tiene un rol protector frente a estados patológicos relacionados con estrés oxidativo como asfixia perinatal, sepsis neonatal, síndrome de distrés respiratorio y displasia broncopulmonar (Gitto et al., 2013; Miller et al., 2012; Buonocore & Groenendaal, 2007). Por todo lo anterior, se le ha atribuido a melatonina un rol neuroprotector en la vida perinatal (Poggi & Dani, 2014). Además de sus efectos beneficiosos, melatonina tiene escasos efectos adversos (Miller et al., 2012; Poggi & Dani, 2014). Sin embargo, se desconoce si una vez retirado el tratamiento, sus efectos en la circulación cerebral permanecen en el tiempo.

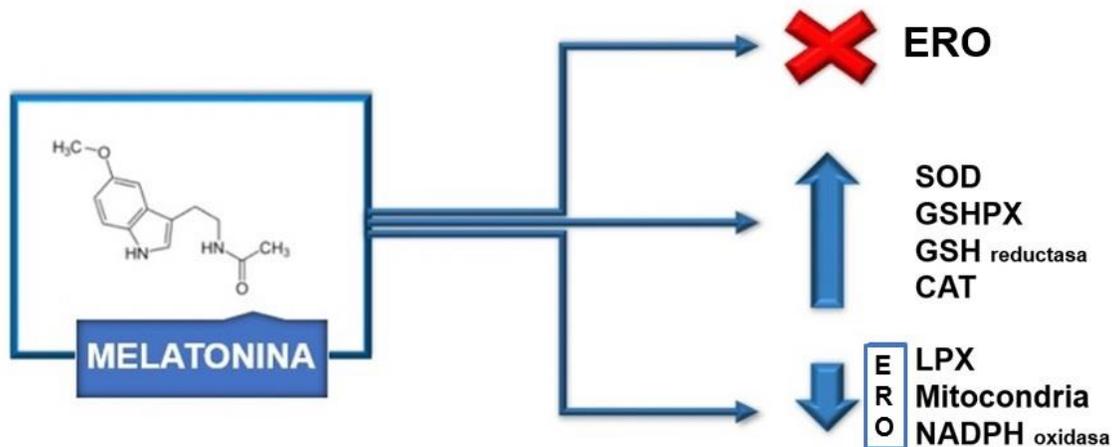


Figura 1. Vías de acción y efectos de melatonina. Melatonina tiene efecto antioxidante debido a que elimina directamente especies reactivas de oxígeno (ERO), activa enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx), glutatión reductasa (GSHreductasa) y catalasa (CAT), y modula negativamente la producción de ERO en fuentes prooxidantes como mitocondria, lipooxigenasas (LPX) y NADPH oxidasa.

Además de los efectos oxidativos, la hipoxia crónica induce remodelamiento vascular, por lo que otro potencial tratamiento es la utilización de agentes antiremodelantes.

Antiremodelantes en el período perinatal

El remodelamiento vascular se refiere a una disminución en el diámetro del lumen y/o a un aumento en el grosor de la pared del vaso sanguíneo (Mulvany, 1999). Los agentes antiremodelantes son los que disminuyen estos cambios morfológicos ya sea actuando en la proliferación celular o el depósito de matriz extracelular (Fredenburgh et al., 2007).

Hemina es un inductor de la enzima hemoxygenasa (Frosch et al., 2015) que puede limitar el remodelamiento de los vasos pulmonares inducido por hipoxia crónica (Fredenburgh et al., 2007; Herrera et al., 2008b; Ebensperger, 2011; Llanos et al., 2012). Esta enzima cataliza el grupo hemo a CO, Fe²⁺ y biliverdina, siendo esta última rápidamente metabolizada a bilirrubina (Theise, 2015; Barret et al., 2016b). Los efectos vasodilatadores de la hemina se asocian a un aumento de la función de la HO, incremento de GCs (Holt et al., 2007; Leffler et al., 2006a) y de los canales de potasio activados por calcio (BKCa) (Jaggar et al., 2002; Koneru y Leffler, 2004; Naik & Walker, 2003).

Los metabolitos producidos por la oxidación del grupo hemo ((CO, Fe²⁺, biliverdina y su derivado metabólico bilirrubina) tienen propiedades antiinflamatorias, antiremodelantes, vasodilatadoras y antioxidantes (Fredenburgh et al., 2007) (Figura 2). Se ha demostrado que la administración de hemina durante 10 días en corderos nacidos en hipoxia crónica se asocia a una reducción significativa en la presión y resistencia vascular pulmonar, además de revertir la hipertrofia ventricular derecha (Ebensperger, 2011). Sin embargo, se desconocen si estos efectos pudiesen replicarse en la circulación cerebral.

La capacidad antirremodelante de hemina se debe a que actúa en células musculares lisas disminuyendo la expresión de ciclina D1 y aumentando la expresión de la p21, ambas importantes proteínas reguladoras del ciclo celular (Kumar et al., 2010; Jeon et al., 2009). Además, p21 produce que CORM-2, un donante de CO, sea capaz de activar la p38-MAPK y por lo tanto, detener el ciclo celular en G0/G1 (Schowe et al., 2010). El CO producido además por la actividad de HO-1 que se sobreexpresa por el tratamiento con hemina inhibe la proliferación de células musculares lisas (Gong, et al., 2004; Vitali et al., 2005; Zuckerbraun et al., 2006).

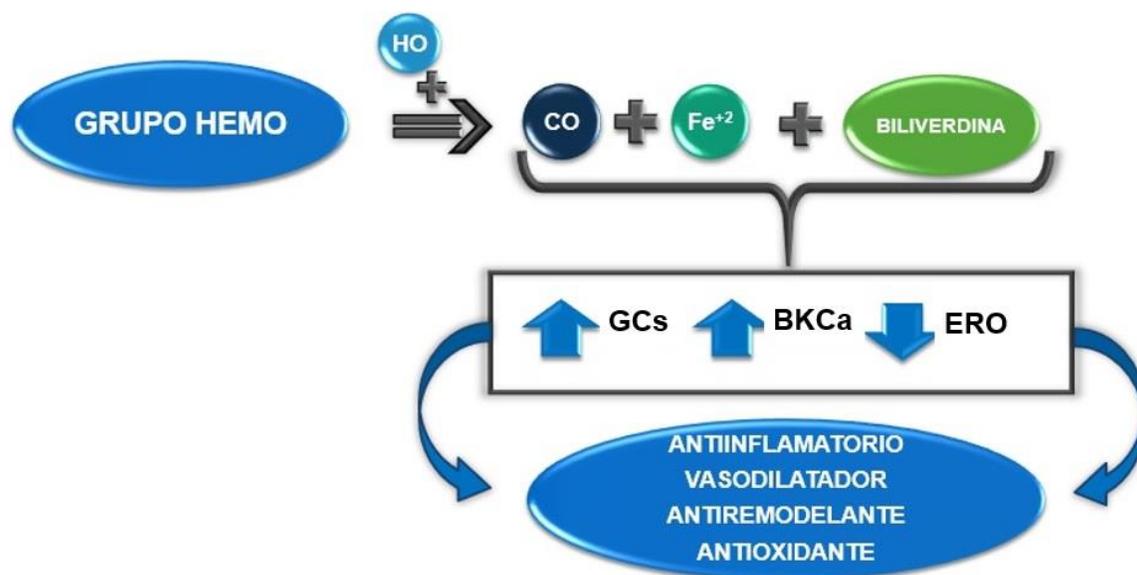


Figura 2. Vías de acción y efectos de hemina. Hemina es un activador de la enzima hemo oxigenasa (HO), que convierte el grupo HEMO en monóxido de carbono (CO), Fe⁺⁺ y biliverdina. Sus efectos directos son aumentar la guanilato ciclasa soluble (GCs) y los canales de potasio activados por calcio (BKCa), y disminuir las especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, los metabolitos de la degradación de hemina presentan un efecto antiinflamatorio, vasodilatador, antiremodelante y antioxidante.

El remodelamiento vascular esta frecuentemente asociado a disfunción endotelial y menor capacidad vasodilatadora por lo que otra de las propuestas terapéuticas en neonatos con hipoxia crónica es el uso de vasodilatadores para compensar la disfunción endotelial.

Vasodilatadores en el período perinatal

Los vasodilatadores producen su efecto a través de la relajación del músculo liso vascular, disminuyendo la resistencia y facilitando el flujo sanguíneo. Dentro de estas sustancias se encuentra el CO (Meng & Gelb, 2014), adenosina, NO, prostacilinas, además de sustancias hiperpolarizantes de la musculatura lisa conocidas como factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHF) (Goto et al., 2018; Giussani, 2016).

Las células endoteliales liberan NO, el más potente vasodilatador conocido que activa la GCs, la que a su vez convierte el GTP a GMPc que activa la proteína quinasa G (PKG), derivando en la disminución del calcio citosólico en la célula muscular lisa, produciendo su relajación (Konukoglu & Uzun, 2016).

Sildenafil es un potente inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), que mejora la biodisponibilidad de GMPc, resultando en vasodilatación (Steinhorn et al., 2009; Herrera et al., 2008) (Figura 3). De esta manera, sildenafil mejora la vasodilatación derivada de NO, la cual está generalmente disminuida en disfunción endotelial. Este fármaco ha demostrado disminuir, de manera aguda, la presión arterial pulmonar en corderos neonatos nacidos en hipoxia crónica de altura (Herrera et al., 2008a). Además, sildenafil es ampliamente recomendado en medicina pulmonar del adulto por sus efectos vasodilatadores (Samiee – Zafarghandy et al., 2014; Steinhorn, 2013; Stulz et al., 2013; Maxted et al., 2013). Sildenafil también ha demostrado mejorar la función hemodinámica cerebral en humanos adultos (Sheng et al., 2017) y producir vasodilatación en arterias cerebrales neonatales de corderos (Polglase et al., 2016). Si bien el tratamiento de neonatos con sildenafil ha mostrado que es bien tolerado, con efectos adversos mínimos como enrojecimiento (Turner et al., 2020), otros estudios apuntan a que en dosis repetidas por 7 días podrían causar hipotensión (Cochius - den Otter et al., 2020). Incluso, el 2018 se reportaron casos de hipertensión pulmonar y muerte en recién nacidos cuyas madres fueron tratadas con sildenafil por 15 días (Simon-Tillaux et al., 2019).

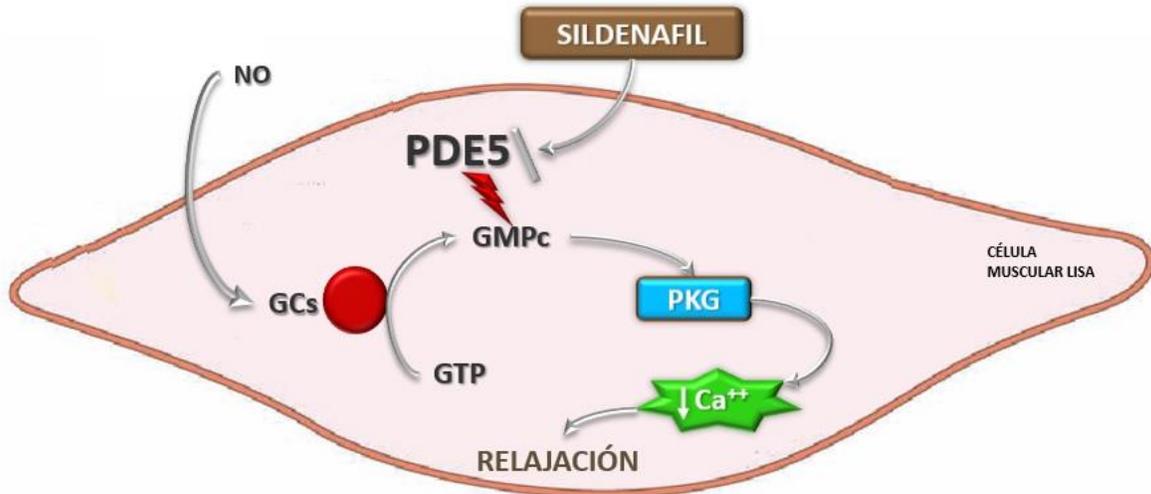


Figura 3. Vías de acción y efectos de sildenafil. Sildenafil es un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) que aumenta la disponibilidad de GMPc. El óxido nítrico estimula la guanilato ciclasa soluble a producir GMPc a partir de GTP, lo que activa la proteína quinasa G (PKG) que disminuye la concentración de calcio citosólico produciendo relajación en la célula muscular lisa.

El tratamiento combinado de un antioxidante, un antiremodelante y un vasodilatador ya ha sido propuesto para su uso en la hipertensión arterial pulmonar neonatal (HAPN), en casos de hipoxia perinatal crónica (Herrera, 2015; González-Candia, 2019). Los efectos del tratamiento combinado de melatonina, hemina y sildenafil han sido evaluados según su respuesta cardiopulmonar y su seguridad farmacéutica, sin demostrar efectos adversos en hígado, riñón o corazón (González, 2020). Sin embargo, aún se desconocen los efectos de este tratamiento en el cerebro postnatal en desarrollo, por lo que en este estudio se pretende determinar los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos, además de la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora en arterias cerebrales medias (ACM) de corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica, sometidos a un tratamiento con melatonina (M), hemina (H), y sildenafil (S). Se estima que un tratamiento con melatonina (vasodilatador y antioxidante), hemina (antiproliferativo, vasodilatador y antioxidante) y sildenafil (vasodilatador) de forma combinada combatiría cada una de las noxas que caracterizan los cuadros de hipoxia crónica perinatal. Se espera que los efectos de estos 3 agentes sean aditivos y sinérgicos, pudiendo ser una terapia adecuada para combatir la HAPN.

HIPÓTESIS

Las ACM de neonatos hipóxicos crónicos tratados con melatonina, hemina o sildenafil por separado poseen una menor respuesta vasoconstrictora y una mayor función vasodilatadora, además de un menor estrés oxidativo y remodelamiento que los animales del grupo control. Estos efectos se potencian en el grupo con terapia combinada en relación con los tratamientos por separado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de melatonina (M), hemina (H) y sildenafil (S) en arterias cerebrales medias (ACM) de corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a 3.600 msnm.

Objetivos Específicos

1. Determinar y comparar la respuesta vasoconstrictora de las ACM en corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a 3.600 msnm, con tratamiento individual o combinado MHS.
2. Determinar y comparar la respuesta vasodilatadora de las ACM en corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a 3.600 msnm, con tratamiento individual o combinado MHS.
3. Determinar y comparar las características morfo-estructurales de las ACM en corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a 3.600 msnm, con tratamiento individual o combinado MHS.
4. Determinar y comparar el nivel de estrés oxidativo de las ACM en corderos gestados y nacidos en hipoxia crónica a 3.600 msnm, con tratamiento individual o combinado MHS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se enmarcó dentro del desarrollo del proyecto FONDECYT Regular N° 1151119 titulado “To be born high and flat (Andean Altiplano): healing vascular function and pulmonary arterial hypertension by a combined treatment in neonatal lambs” dirigido por el Dr. Emilio Herrera Videla, del Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, Programa de Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile aprobó todos los procedimientos experimentales de este estudio (protocolo CBA #0761 FMUCH). Todos los estudios en animales siguieron la guía ARRIVE y fueron realizados acorde con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el US National Institutes of Health (NIH publication no. 85–23, revisado en 1996).

Animales

Se utilizaron 26 corderos que fueron concebidos, gestados, nacidos y estudiados en la Estación Experimental Putre (3600 m), en el *International Center for Andean Studies* (INCAS), de la Universidad de Chile. El número total de animales utilizados fue el mínimo necesario para que se pudieran dividir en 5 grupos de tratamientos, permitiendo dentro de cada grupo cumplir con todos los objetivos experimentales (Herrera et al., 2015). La posología de los fármacos en cada tratamiento fue la utilizada de forma exitosa en estudios previos de hipertensión arteria pulmonar neonatal en corderos (Herrera et al., 2015, Gonzalez-Candia et al., 2020).

Los neonatos fueron aleatoriamente divididos en los siguientes cuatro grupos experimentales:

1. Control (**CN**, n=6, 0,5 mL EtOH 1.4%/kg por día), recibió vehículo oral por 20 días (día 4 al 23 de edad).
2. Melatonina (**M**, n=6, 1mg/kg por día), oral durante 20 días al anochecer (día 4 al 23 de edad).
3. Hemina (**H**, n=4, 10 mg/kg por día), subcutáneo (sc) durante 10 días en la mañana (día 4 al día 13 de edad).

4. Sildenafil (**S**, n=5, 1 mg/kg cada 12 horas), intravenoso (iv) durante 5 días (día 4 a 8 de edad)

5. Triterapia (**HMS**, n=5), recibió los 3 fármacos en las dosis y ventanas terapéuticas descritas en los grupos anteriores.

Las dosis fueron preparadas y administradas diariamente por el mismo operador. Los animales fueron eutanasiados a los 30 días de edad con una sobredosis de Tiopental sódico (100 mg/kg i.v.) y sus arterias cerebrales medias fueron recolectadas para los diferentes estudios (Figura 4).

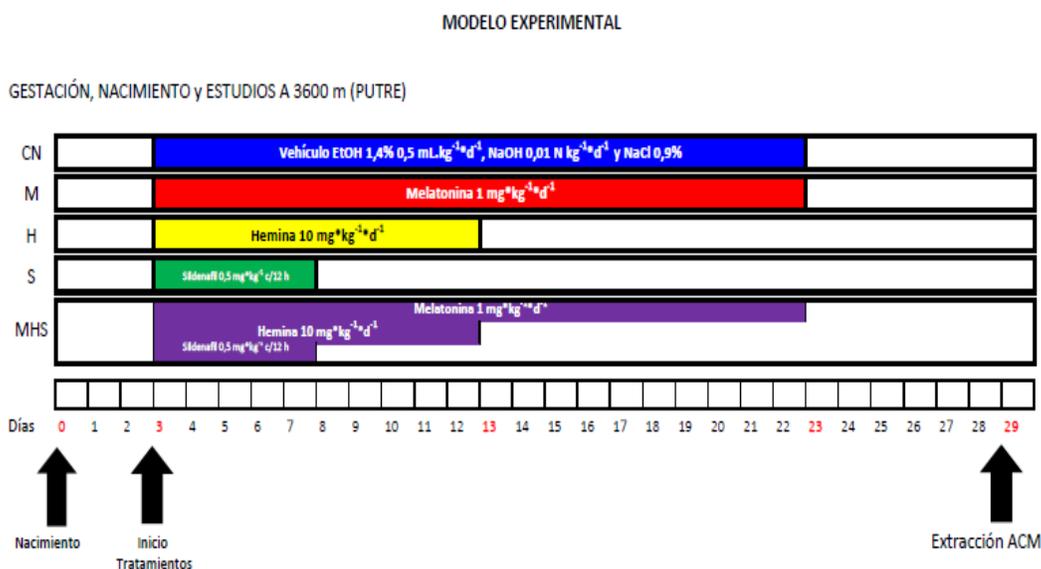


Figura 4. Modelo experimental. Esquema de los 5 grupos experimentales con la dosificación y ventana terapéutica de cada uno de los fármacos utilizados.

Función vascular ex vivo - Miografía de alambre

Las ACM fueron disecadas, seccionadas en anillos de 2 mm de largo y montadas en un miógrafo de alambre (DMT 610 Danish Technologies, Aarhus, Denmark), mantenidas a 37 °C y aireadas con 95% O₂-5% CO₂. El diámetro óptimo fue obtenido por extensión de los vasos de una manera paulatina a una tensión estandarizada equivalente a la presión transmural fisiológica de 80 mmHg (Herrera et al., 2010). Las curvas de concentración respuesta (CCRs) fueron analizadas en términos de sensibilidad y respuesta máxima por ajustes de datos experimentales a una ecuación sigmoidea dosis-respuesta (Prism 5.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Las respuestas contráctiles al incremento de concentración de K⁺ (4.72

- 64.86 mM) fueron expresadas en términos de tensión (mN/mm), mientras que las respuestas a serotonina (5Ht, 10^{-10} - 10^{-5} M), al mimético de tromboxano (U46619, 10^{-15} - 10^{-7} M) y a endotelina-1 (ET-1, 10^{-15} - 10^{-7} M), fueron expresadas como porcentaje de la tensión generada por una concentración sub máxima de 20 mM de K^+ . Las respuestas de relajación al activador de endotelio, metacolina (MetCh, 10^{-11} - 10^{-5} M), y al donante de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP, 10^{-10} - 10^{-3} M), fueron expresadas como un porcentaje de la preconstricción con una dosis submáxima de serotonina (5Ht, 10^{-6} M). La sensibilidad fue calculada como pD₂, donde pD₂=-log [EC₅₀] con EC₅₀ siendo la concentración que alcanza el 50% de la respuesta máxima (Torres et al., 2015; Herrera et al., 2015).

Características morfoestructurales - Histología

Durante la disección se extrajeron anillos de ACM de 2-3 mm de longitud que fueron inmersos en 4% de paraformaldehído por 24 horas a 4°C, seguido de baños y conservación en PBS + 0.1% azida de sodio a 4°C. Estas muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol, luego aclaradas en xilol e incluidas en parafina sólida para obtener cortes de 5 µm de espesor que fueron colocados sobre un portaobjetos. A estos cortes se le extrajo la parafina con xilol y luego fue rehidratada con concentraciones decrecientes de alcohol. El tejido fue teñido con hematoxilina y eosina (HE) y cubierta con un cubreobjetos mediante un medio de montaje (Anexo 1). Con esta tinción se analizó la morfoestructura, diámetro interno (DI), diámetro externo (DE), grosor de pared (GP), razón lumen pared (L/P) y densidad nuclear (Nº Núcleos/area) (Astorga et al., 2018).

Para la caracterización morfológica vascular, las imágenes fueron capturadas a 100x con una cámara digital acoplada a un microscopio (Olympus BX-41; Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Las dimensiones de las arterias fueron determinadas usando un software analizador de imágenes (Image-Pro Plus 6.2; Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) (Torres et al., 2015; Astorga et al., 2018).

Estrés oxidativo y expresión de proteínas - Inmunohistoquímica

Los cortes de ACM incluidos en parafina se utilizaron para la detección de proteínas por inmunohistoquímica. Para esto, se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos en las condiciones de incubación especificadas:

- Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS; eNOS n_610296, BD Transduction Labs; 1:400; incubación *overnight*).

- Alfa-actina como marcador de músculo liso e indicador de remodelamiento (A-5228 anti- α -actina, Sigma-Aldrich; 1:750; incubación 2h)
- 4-hidroxi-2,3-nonenal (4HNE) como marcador de estrés oxidativo (anti-NT, 05-233; EMD Millipore Corporation; anti-4-HNE, ab46545, Abcam Labs; 1:400; incubación 2h).

Posterior a estas incubaciones con el anticuerpo primario, se incubó con el anticuerpo secundario (Envision K4007, Dako) por 90 min. Las imágenes fueron capturadas digitalmente a 100x con una cámara digital acoplada a un microscopio (Olympus BX-41; Olympus Corporation, Tokyo, Japan, Anexo 1) y analizadas en un programa contador específico de color-píxel por área (Adobe Photoshop CS6 v13.0 EXTENDED). Este método se basa en la selección digital de un espectro de color en relación a un control positivo para determinar la intensidad de cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos. La intensidad de la marca fue entonces dividida por el área de las capas ($\text{pixels}/\mu\text{m}^2$) de las ACM.

Expresión de resultados y análisis estadístico

Para la miografía de alambre la respuesta vascular a potasio fue analizada usando el análisis de Boltzmann, determinando la tensión máxima efectiva (E_{max}) y la concentración media máxima efectiva (EC_{50}). Todas las otras curvas de concentración respuesta (CCRs) fueron analizadas usando una ecuación de ajuste óptimo de respuesta agonista donde la máxima respuesta vasomotora fue expresada como porcentaje de la concentración sub máxima inducida por K^+ [20 mM] para vasoconstrictores, y 5Ht [10^{-6} M] para vasodilatadores. Además, se determinó la respuesta máxima (% K_{max} para constricción y % R_{max} para relajación), y la sensibilidad fue expresada como pD_2 ($-\log EC_{50}$). Todas las razones y porcentajes fueron transformadas en arcoseno antes de someterlas a análisis estadístico. Para todos los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos y los resultados fueron comparados mediante ANOVA de una vía y la prueba de Dunn. Las significancias estadísticas fueron aceptadas con $P \leq 0,05$ (Prism 5.0; GraphPad Software) (Herrera, 2015). Los datos fueron expresados como promedios \pm S.E.M.

RESULTADOS

Función vasoconstrictora de las ACM

Al determinar la función contráctil de las ACM aisladas mediante miografía de alambre, los tratamientos con hemina, sildenafil y triterapia aumentaron la capacidad máxima contráctil y la sensibilidad en respuesta a K^+ (Fig. 5A). Las ACM de los animales tratados con hemina mostraron una mayor respuesta máxima a serotonina, siendo su sensibilidad similar a la del grupo control. En contraste, sildenafil indujo una disminución de la respuesta máxima ante este vasoconstrictor. Además, tanto sildenafil como la triterapia indujeron una disminución en la sensibilidad a serotonina (Fig. 5B). Frente al mimético de tromboxano, hemina aumentó la respuesta contráctil máxima, mientras que sildenafil la disminuyó. Además, hemina y la triterapia disminuyeron la sensibilidad frente a este vasoconstrictor, mientras que sildenafil la aumentó (Fig. 6A). Finalmente, las arterias de animales tratados con sildenafil y triterapia disminuyeron la capacidad contráctil frente a ET-1, además de mostrar una menor sensibilidad junto a hemina (Fig. 6B).

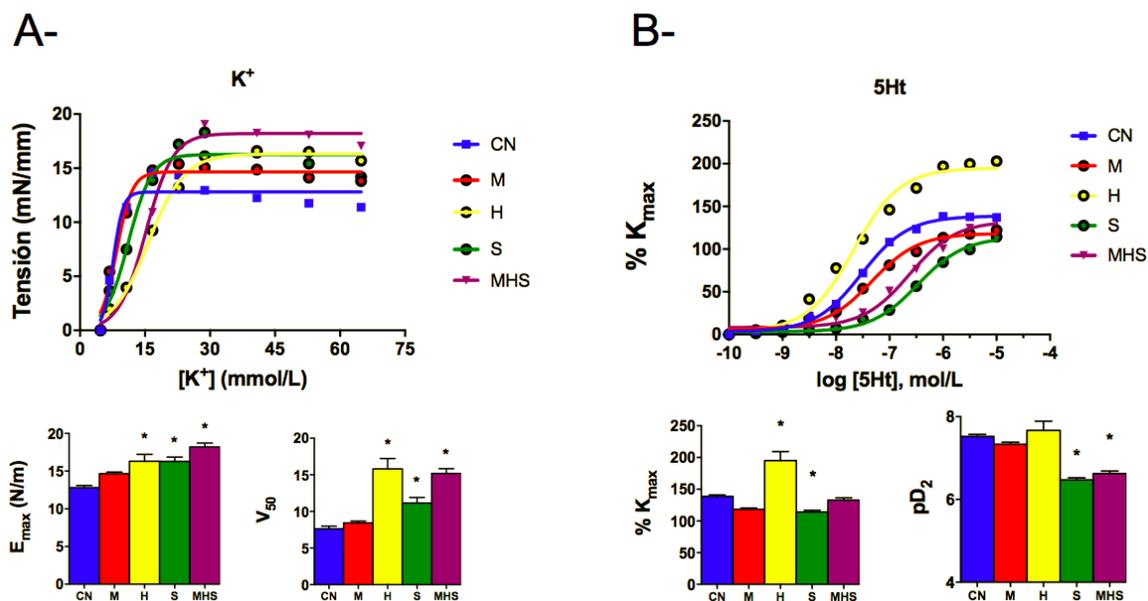


Figura 5. Función vasoconstrictora de arterias cerebrales medias (ACM) 1. Curvas de concentración-respuesta, respuesta máxima (E_{max} o % K_{max}) y sensibilidad (V_{50} o pD_2) a potasio (K^+ , **A**) y serotonina (5HT, **B**). Los grupos experimentales son vehículo (CN, cuadrados/barras azules), melatonina (M, círculos rojos, barras rojas), hemina (H, círculos/barras amarillas), sildenafil (S, círculos/barras verdes) y triterapia (MHS, triángulos/barras morados). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Diferencia significativa ($P \leq 0,05$): * vs CN.

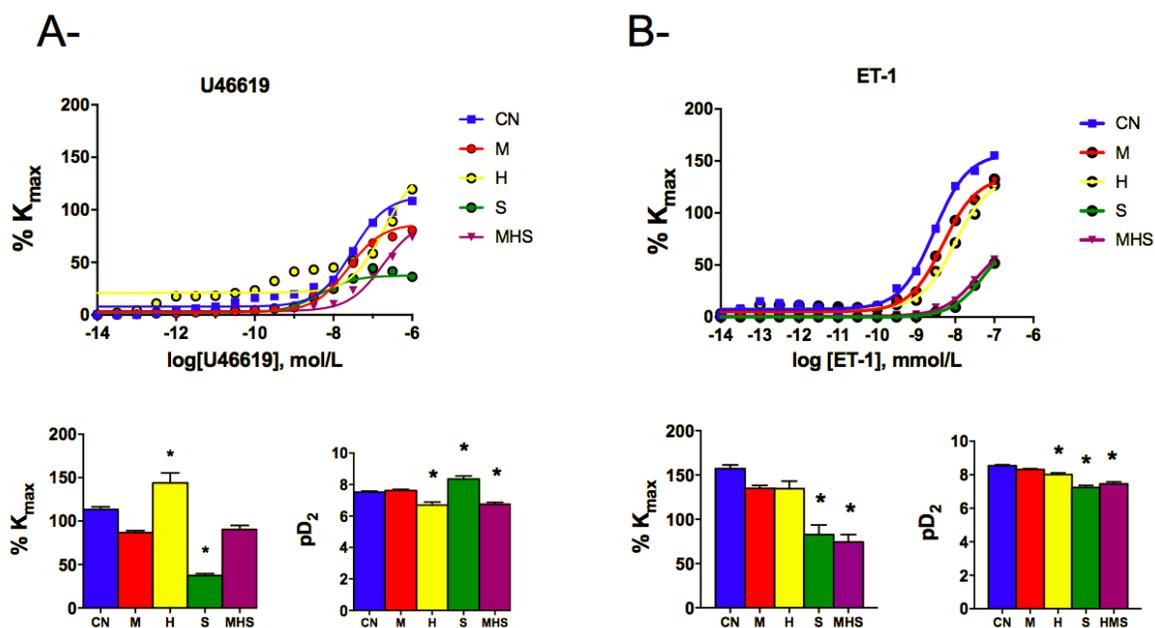


Figura 6. Función vasoconstrictora de arterias cerebrales medias (ACM) 2. Curvas de concentración-respuesta, respuesta máxima (% K_{max}) y sensibilidad (pD₂) a tromboxano mimético (U46619, **A**) y endotelina-1 (ET-1, **B**). Los grupos experimentales son vehículo (CN, cuadrados/barras azules), melatonina (M, círculos rojos, barras rojas), hemina (H, círculos/barra amarilla), sildenafil (S, círculos/barras verdes) y triterapia (HMS, triángulos/barras morados). Los valores se expresan como promedio ± S.E.M. Diferencia significativa (P ≤ 0,05): * vs CN.

Función vasodilatadora de las ACM

Respecto a la función vasodilatadora, ninguno de los tratamientos produjo diferencias significativas en la respuesta vasodilatadora máxima frente a SNP, un donante de NO, aunque la sensibilidad fue mayor en las ACM tratadas con sildenafil (Fig.7A). En contraste, los tratamientos con hemina, melatonina y sildenafil muestran una mayor respuesta vasodilatadora frente a metacolina (Fig. 7B).

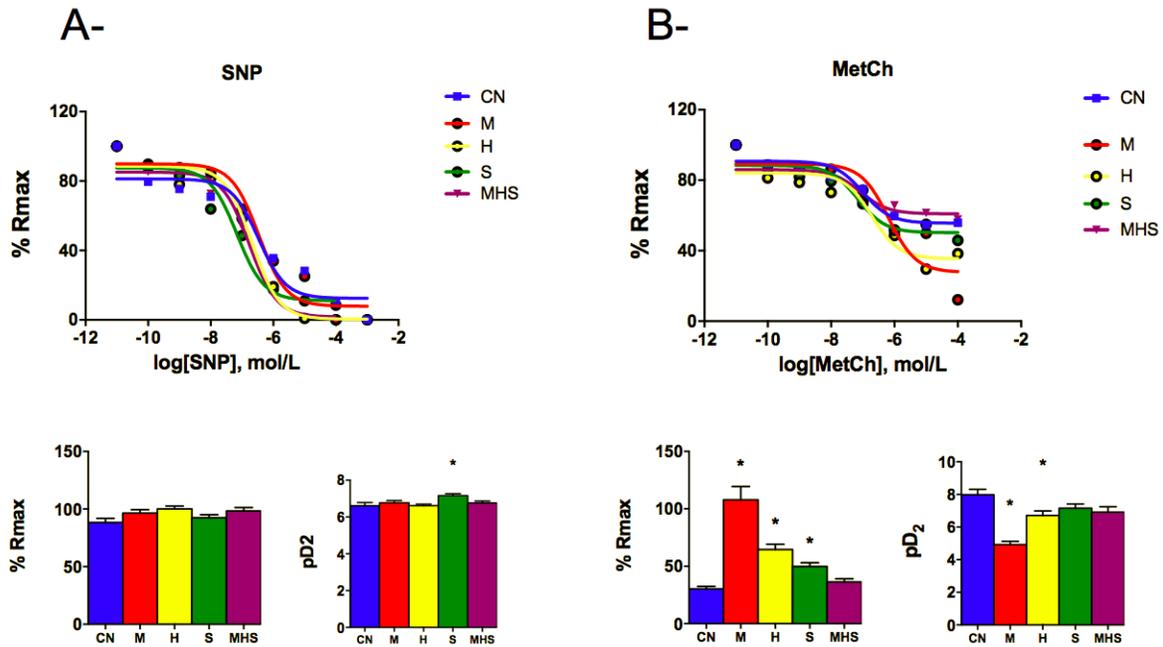


Figura 7. Función vasodilatadora de arterias cerebrales medias (ACM). Curvas de concentración respuesta, respuesta máxima (%Rmax) y sensibilidad (pD₂) a nitroprusiato de sodio (SNP, **A**) y metacolina (MetCh, **B**). Los grupos experimentales son vehículo (CN, cuadrados/barras azules), melatonina (M, círculos rojos, barras rojas), hemina (H, círculos/barra amarilla), sildenafil (S, círculos/barras verdes) y triterapia (HMS, triángulos/barras morados). Los valores se expresan como promedio ± S.E.M. Diferencia significativa (P ≤ 0,05): * vs CN.

Morfología e inmunohistoquímica de las ACM

Tanto el grosor de pared (Fig. 8A), como el diámetro interno (Fig. 8B), diámetro externo (Fig. 8C), razón lumen/pared vascular (Fig. 8D) y conteo de núcleos (Fig. 8E) evaluado con la tinción HE en las ACM, no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 1). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a la cantidad de músculo liso presente en la pared arterial al ser evaluado por el contenido de α -actina (Fig. 9; Anexo 1). Con respecto al marcador 4HNE de estrés oxidativo, todos los tratamientos presentaron similares niveles, excepto sildenafil que mostró una marca significativamente mayor con respecto a CN (Fig. 10; Anexo 1). Además, todos los grupos presentaron un contenido similar de eNOS en las ACM (Fig. 11; Anexo 1).

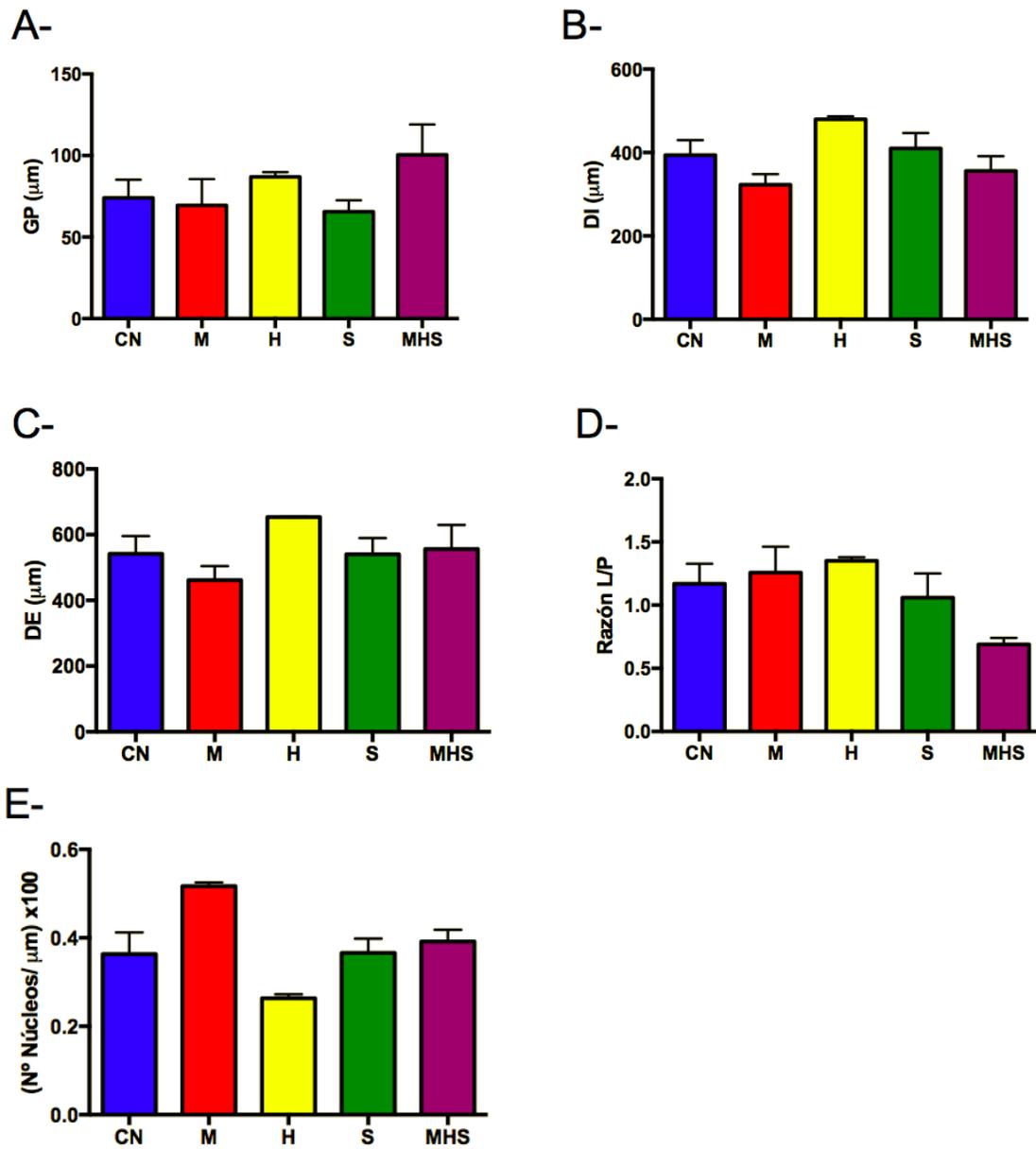


Figura 8. Características morfométricas de las arterias cerebrales medias (ACM). Grosor de pared (A, GP); diámetro interno (B, DI); diámetro externo (C, DE), razón lumen pared (D, Razón L/P) y número de núcleos (E, N° Núcleos) . Los grupos experimentales son vehículo (CN, barra azul), melatonina (M, barra roja), hemina (H, barra amarilla), sildenafil (S, barra verde) y triterapia (HMS, barra morada). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M.

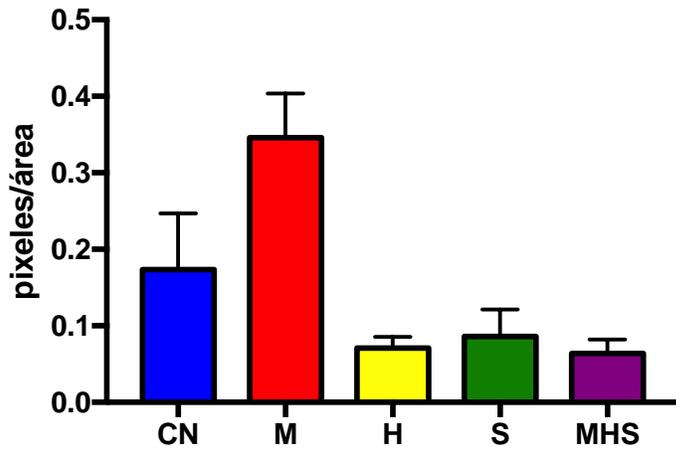


Figura 9. Contenido de α -actina en las arterias cerebrales medias (ACM). Cuantificación IHQ del marcador de músculo liso alfa-actina en ACM. Los grupos experimentales son vehículo (CN, barra azul), melatonina (M, barra roja), hemina (H, barra amarilla), sildenafil (S, barra verde) y triterapia (HMS, barra morada). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M.

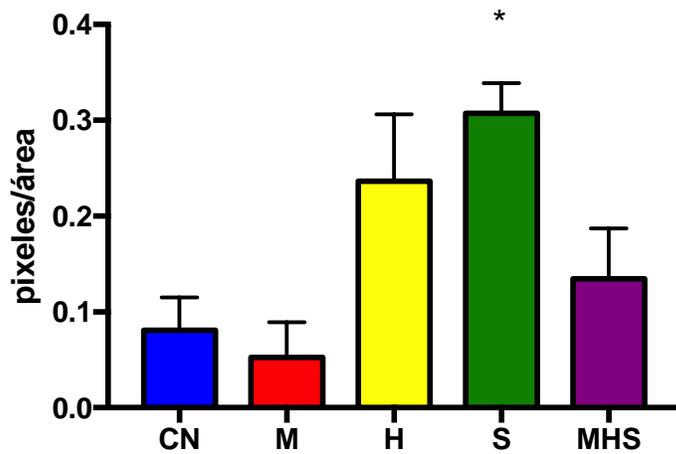


Figura 10. Contenido de 4HNE en las arterias cerebrales medias (ACM). Cuantificación IHQ del marcador de estrés oxidativo 4HNE en ACM. Los grupos de tratamiento son vehículo (CN, barra azul), melatonina (M, barra roja), hemina (H, barra amarilla), sildenafil (S, barra verde) y triterapia (HMS, barra morada). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M. Diferencia significativa ($P \leq 0.05$): * vs CN.

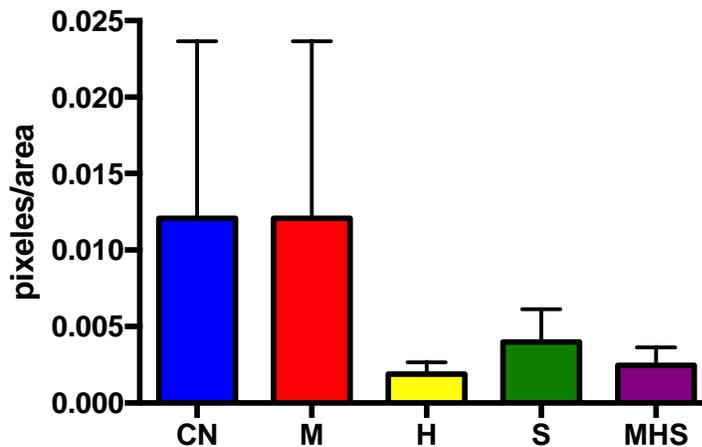


Figura 11. Expresión de eNOS en las arterias cerebrales medias (ACM). Cuantificación IHQ del marcador de eNOS en ACM. Los grupos de tratamiento son vehículo (CN, barra azul), melatonina (M, barra roja), hemina (H, barra amarilla), sildenafil (S, barra verde) y triterapia (HMS, barra morada). Los valores se expresan como promedio \pm S.E.M.

DISCUSIÓN

En este estudio se determinó la respuesta vasoactiva mediante miografía de alambre, además de la morfología y la inmunohistoquímica de ACM en corderos neonatos gestados y nacidos en hipoxia crónica, los que se dividieron en 5 tratamientos distintos: control, melatonina, hemina, sildenafil y triterapia (MHS). Se demostró que los tratamientos producen un efecto vasodilatador *ex vivo* mejorando la función endotelial frente a MetCh. A la vez, los tratamientos aumentaron la capacidad contractil frente a K, pero con respuestas variables a los vasoconstrictores evaluados. El único tratamiento que presentó una menor respuesta vasoconstrictora a todos los fármacos fue sildenafil. Además, ninguno de los tratamientos demostró producir cambios a nivel morfoestructural ni inmunohistoquímico que indiquen una mejor función vascular. En contraste, el grupo de sildenafil presentó un aumento del marcador estrés oxidativo (4HNE) en las ACM. Los resultados obtenidos solo concuerdan respecto a la función vasodilatadora *ex vivo* con la hipótesis planteada, no encontrándose concordancia frente a la función vasoconstrictora, morfología ni inmunohistoquímica.

Melatonina

La vasoconstricción producida por K⁺ se asocia a la despolarización de la membrana de la célula muscular lisa (Gilbert et al., 2003). Un aumento de esta respuesta, se asocia a mayor expresión/actividad de receptores α -adrenérgicos, mayor masa muscular y mayor sensibilidad a Ca²⁺ intracelular (Herrera et al., 2010). El hecho de no presentar diferencias en la capacidad contráctil sugiere que estos mecanismos estarían funcionando de manera similar en el grupo control y melatonina. Se describe que melatonina podría tener un efecto vasodilatador bloqueando los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 en músculo liso y en menor grado, en células endoteliales. Además, en arterias caudales de rata existe un efecto vasodilatador directo que ejerce melatonina activando principalmente los receptores MT2 en músculo liso, aunque también se describe su presencia en endotelio (Pandi-Perumal et al., 2006; Zawilska, 2009; Grossini et al., 2011). En arterias cerebrales fetales melatonina puede disminuir la contracción inducida por epinefrina debido a inhibición simpática local, proceso aparentemente mediado por el bloqueo de los receptores adrenérgicos (Torres et al., 2008). Además, previos estudios de nuestro laboratorio han registrado una disminución de la capacidad contráctil y menor resistencia carotídea con el tratamiento de melatonina por 1 semana (Herrera et al., 2014). Estos efectos no se observaron en esta Tesis, pero a pesar de que, melatonina no modificó la capacidad contráctil o vasodilatadora *ex vivo*, si pudo haber inducido directamente una vasodilatación *in vivo*. De hecho, existe evidencia de que melatonina tiene un efecto vasodilatador en arterias de neonatos (Herrera &

González-Candia, 2020). La respuesta a esta observación queda pendiente pues en los corderos estudiados en esta Tesis no se realizaron determinaciones in vivo de circulación cerebral.

ET-1 y tromboxano producen vasoconstricción estimulando receptores específicos en la membrana plasmática de la célula muscular lisa vascular y produciendo un aumento de calcio intracelular (Andresen et al., 2006a). Frente a la administración exógena de mimético de tromboxano y ET-1, el grupo tratado con melatonina no evidenció tener acción sobre la respuesta a estos vasoconstrictores. Resultados similares se observaron en corderos de altura que recibieron un tratamiento de melatonina por 7 días (Herrera et al., 2014). ET-1 es un potente vasoconstrictor que se sintetiza y libera principalmente en las células endoteliales (Andresen et al., 2006a), el cual es un factor mitogénico e hipertrófico en la musculatura lisa vascular que produce además remodelamiento de la matriz extracelular (Konukoglu & Uzun, 2017). Su efecto sobre los receptores de las células musculares lisas activa las vías de contracción tanto dependientes como independientes de calcio (Andresen et al., 2006a). Asociado a lo anterior, melatonina no modificó el espesor de la capa media ni los marcadores de α -actina en el análisis morfológico e inmunohistoquímico. A pesar de no ser un resultado consistente con nuestra hipótesis que establecía un menor remodelamiento vascular, estos hallazgos si son consistentes entre ellos, no habiendo cambios de respuesta vasoconstrictora ni cambios estructurales de ACM por melatonina.

Melatonina no indujo cambios en la vasodilatación frente a SNP, un donante de NO, pero sí tuvo un mayor efecto en la dilatación dependiente de endotelio con metacolina. Esto indica que melatonina es capaz de mejorar la función endotelial, lo que no sería debido a un aumento de eNOS, ya que la inmunohistoquímica no demostró diferencias respecto al control, pero se podría deber a una mejor activación de esta y mayor generación o biodisponibilidad de NO. Así, melatonina podría estar mejorando el acoplamiento de la eNOS, su correcto funcionamiento y la mayor biodisponibilidad de NO en el territorio cerebrovascular (Herrera et al., 2014). También, melatonina podría estar actuando por mecanismos independiente de NO. Por ejemplo, a través del bloqueo adrenérgico (Torres-Farfan et al., 2008) o mediante el estímulo de vasodilatadores locales como prostaciclina, EDHF o CO (Herrera et al., 2014b). Se ha descrito que melatonina estimula la HO-1 (Kwon et al., 2011), enzima que produce CO tanto en el endotelio como en la musculatura lisa (Mitchell, 2015), siendo este un posible mecanismo involucrado en la vasodilatación inducida por melatonina.

Melatonina tiene efectos sobre el estrés oxidativo eliminando directamente ERO como OH⁻ y \bullet O₂⁻ (Reiter et al., 2010; Tan et al., 2003). Otra de sus propiedades

antioxidantes está relacionada con la regulación positiva de enzimas antioxidantes como dismutasas, peroxidasas y enzimas que producen glutatión (Reiter et al., 2010; González-Candia et al., 2019). Además, melatonina ejerce una regulación negativa de vías y enzimas prooxidantes, como las que producen ERO mitocondriales (Zhang et al., 2012; Yang et al., 2013; González-Candia et al., 2019) y lipooxigenasas (Reiter et al., 2003). También, se ha observado que tiene un efecto directo en la dilatación de arterias pulmonares (Poggi & Dani, 2014; Torres et al., 2015) y otros territorios vasculares (Reiter et al., 2010; Thakor et al., 2010). Estos efectos podrían ser por mecanismos dependientes e independientes de NO (Herrera et al., 2014). A nivel vascular y nervioso, melatonina ha demostrado tener propiedades antioxidantes captando radicales libres y generando metabolitos oxidados (Bonfont-Rousselot et al., 2011). Además su propiedades antiinflamatorias están mediadas por MT1-2, receptor del factor de necrosis tumoral y receptores tipo Toll (Randhawa & Gupta, 2020) y antiapoptóticas mediada por su capacidad antioxidante (Kaur et al., 2010; Kaur et al., 2013), lo cual podría mejorar la función endotelial. Presumiblemente durante la etapa fetal, el cerebro de los corderos de este estudio se estaría oxigenando normalmente debido a que se mantiene el flujo al encéfalo y corazón a expensas de otros órganos como intestino, extremidades inferiores y riñones (Kamitomo et al., 1993); por lo tanto, es posible que no se haya producido una marcada hipoxia o estrés oxidativo en estas arterias. Esto podría explicar que las repercusiones en ACM y cerebro no son considerables en la etapa neonatal, ni los efectos de melatonina son marcados (Herrera et al., 2014; Farias et al., 2016).

Los efectos de melatonina sobre el tono vascular varían dependiendo del territorio y la especie estudiada. Así, se ha observado que produce vasoconstricción en arterias cerebrales en ratones (Geary et al., 1997), vasodilata arterias mesentéricas y aorta en ratas (Girouard et al., 2001), contrae arterias coronarias en porcinos (Yang et al., 2001), dilata arterias umbilicales (Thakor et al., 2010) y pulmonares en corderos (Herrera & González-Candia, 2020), mientras que en ser humano no produce cambios en arterias cerebrales, pero si vasoconstricción de arterias renales (Cook et al., 2011). También se ha demostrado que melatonina mejora la función vascular pulmonar sin producir cambios en la circulación sistémica (Torres et al., 2015). Claramente melatonina tiene una gran diversidad de efecto vasoactivos, dependiendo del tipo de receptor (MT1 o MT2) que predomine en el territorio estudiado, y si su localización predomina en endotelio o capa media (Chucharoen et al., 2007; Masana et al., 2002). Con respecto a los receptores, se describe que MT1 tiene una alta expresión en ACM de bovinos (Chucharoen et al., 2007), y aunque no hay antecedentes de su expresión en corderos, es probable que también formen parte de un mecanismo vasodilatador en esta especie. Futuros

estudios que permitan cuantificar la expresión y función de MT1 y MT2 en ACM, tanto en corderos como en seres humanos, ayudarían a dilucidar estas vías.

En esta tesis, melatonina no tuvo los efectos esperados al ser evaluada la función y estructura de las ACM a los 30 días. Esto se podría deber a que cualquier efecto que tuvo la administración de melatonina no perdura en el tiempo y se revierte a la semana de haber terminado el tratamiento. También se podría deber a que la dosis de melatonina necesaria para producir un efecto a nivel de arterias cerebrales no sea el adecuado. Debemos recordar que el régimen de dosificación de melatonina esta dirigido al tratamiento de la hipertensión pulmonar del neonato, donde si se observaron efectos beneficiosos a nivel de la circulación pulmonar (González-Candia et al., 2020; Herrera & González-Candia, 2020).

Hemina

El tratamiento con hemina aumenta la vasoconstricción en ACM ante potasio, serotonina y el mimético de tromboxano U46619. Se observó también que hemina produce una disminución de la sensibilidad a ET-1. De acuerdo con el efecto antirremodelante de hemina, en esta tesis esperábamos tener menor capa muscular y por lo tanto una menor respuesta vasoconstrictora. Sin embargo, encontramos un aumento de la respuesta a la mayoría de los vasoconstrictores evaluados. Esto puede deberse a que hemina pudo haber tenido un efecto vasodilatador y antirremodelante al aumentar la expresión de HO mientras perduraba el tratamiento, los primeros 10 días. Luego, al retirarse el medicamento, los mecanismos que habían sido suprimidos volvieron a activarse y a presentarse con efecto mayor al grupo control debido a las concentraciones de ácido araquidónico (AA) disponible para la activación de COX-1, COX-2 y TX sintasa que generan moléculas vasoconstrictoras como PGs y TXs (Abraham & Kappas, 2011; Li et al., 2011), pero sin llegar a alcanzar cambios significativos a nivel histológico según se mostró en los resultados. Es interesante evaluar bajo estos mecanismos las diferentes respuestas del tono vascular, de esta forma serotonina muestra una respuesta significativamente elevada relativa al control. Al respecto, se ha descrito que serotonina además de generar un efecto vasoconstrictor, también actúa a nivel de las células musculares lisas aumentando su sensibilidad a otros factores contráctiles, como noradrenalina, angiotensina II, y en forma indirecta, liberando y desplazando noradrenalina desde los terminales nerviosos (Van Nueten et al., 1985). Por otro lado, el tratamiento con el mimético de tromboxano U46619 genera una doble sigmoide en la gráfica de dosis-respuesta. Estas dos fases de respuesta podrían ser explicadas por la presencia de dos isoformas del receptor de TX, sin embargo, esto solo se ha caracterizado en humanos (Smyth, 2010). El receptor de TX se encuentra tanto en músculo liso como en endotelio pero en rangos de expresión

distinto, ya que en condiciones fisiológicas hay una mayor expresión en músculo liso que en endotelio, pero frente a condiciones patológicas como en hipertensión arterial, la expresión del receptor aumenta a nivel endotelial (Pfister, 2008). Por lo tanto, ambas fases de respuesta contráctil frente al mimético de tromboxano U46619 pueden deberse a la expresión diferencial del receptor en tipos celulares, generando diferencias en la sensibilidad de la respuesta vascular. Bajo las condiciones experimentales de esta tesis, fue imposible poder definir si hubo o no efecto antirremodelante durante el tratamiento de hemina, y para comprobar esto habría que evaluar la función y estructura de las ACM durante el tratamiento.

En relación con la función vasodilatadora, hemina no produjo cambios con respecto al control cuando se mide la respuesta a SNP, pero si presenta mayor vasodilatación ante metacolina, indicando que la función vasodilatadora fue mejorada a nivel endotelial. Además, de este resultado se puede desprender que la vía óxido nítrico a nivel de la musculatura lisa no es afectada por el tratamiento con hemina. Los efectos vasodilatadores de hemina se asocian a un aumento de la función de la hemo oxigenasa (HO), que cataliza el grupo hemo a monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina (Theise, 2015; Barret et al., 2016b), incremento de la guanilato ciclasa soluble (sCG) (Holt et al., 2007; Leffler et al., 2006a) de los canales de potasio activados por calcio (Jaggar et al., 2002; Koneru & Leffler, 2004) y a un retroceso del remodelamiento cardiopulmonar (Fredenburgh et al., 2007). De esta manera, a nivel endotelial podría mejorarse la función endotelial gracias a los efectos de HO, CO y los catabolitos biliverdina y bilirrubina. A nivel vascular, CO es capaz de estimular GCs para producir GMPc, activando quinasas que producen la relajación del músculo liso (Motterlini & Otterbein, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que el CO endógeno en concentraciones fisiológicas producido por la HO no es un dilatador en ACM en ratas y ratones adultos, las cuales si responden al efecto vasodilatador del NO (Andresen et al., 2006b), sugiriendo que el mecanismo de activación de GCs es diferente para ambos. El proceso que genera CO en la célula endotelial debido a la acción de HO produce también bilirrubina y biliverdina, que tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Fredenburgh et al., 2007), pudiendo estos metabolitos actuar disminuyendo la oxidación de la GCs y mejorando su función.

La isoforma constitutiva HO-2 se expresa en altas concentraciones en astrocitos y el endotelio del cerebro neonatal (Leffler et al., 2006b), por lo que este órgano produciría altas cantidades de CO. El efecto vasodilatador de CO sería dependiente de la edad, el territorio, la especie animal y el tiempo de exposición. Por ejemplo, en los vasos sanguíneos del músculo esquelético de ratas sometidos prolongadamente a CO se ha observado vasoconstricción debido a la inhibición de la eNOS (Knecht et al., 2010; Johnson & Johnson, 2003). En cerdos recién nacidos,

la vasodilatación producida por CO puede ser bloqueada si estos reciben tratamiento con inhibidores de NOS (Barkoudah et al., 2004; Carratu et al., 2003).

Estudios en arterias cerebelares y renales de ratas sugieren que la eNOS de estos órganos puede ser inhibida o suprimida por CO (Thorup et al., 1999; White & Marletta, 1992). El CO tampoco produce dilatación de la arteria basilar de conejos y perros (Brian et al., 1994), pero si produce en aortas de rata y conejo (Brian et al., 1994; Foresti et al., 2004) arteriolas del gracilis (Johnson & Johnson, 2003) y arterias mesentéricas (Naik et al., 2003; Naik & Walker, 2003) en ratas, indicando que en una misma especie puede generar distintos efectos en diferentes vasos sanguíneos. Esto sugiere que las dosis constantes de hemina específicamente en ACM durante los primeros días de vida, podrían producir que el CO generado inhiba la acción de la eNOS, pudiendo favorecer la mayor vasoconstricción observada en la respuesta de miografías, además de mejorar la vasodilatación independiente de NO. Sería interesante en futuros estudios utilizar un inhibidor de HO para verificar que el efecto vasoactivo de CO en ACM, además de medir los niveles de CO y la actividad HO.

Respecto al remodelamiento de las ACM, no se observaron diferencias en los factores analizados en comparación al grupo control. De la misma manera, los resultados de histología e inmunohistoquímica de α -actina sugieren que el mecanismo antirremodelante producido por hemina no se encuentre activo en las ACM bajo condiciones de hipoxia crónica en neonatos (Longo et al., 1993; Gilbert et al., 2003). Sin embargo, se desconoce si en nuestro modelo, la hipoxia crónica de altura genera remodelamiento de las ACM. Para responder esta interrogante, se debiese generar un grupo control de tierras bajas, que aún no disponemos. Futuros estudios del Laboratorio indagarán en este aspecto.

Sildenafil

En cuanto al tratamiento con sildenafil, este fármaco indujo una mayor respuesta contráctil frente a K^+ . Como se comentó anteriormente, una mayor capacidad contráctil podría estar dada por mayor masa muscular o mayor sensibilidad a señales de Ca^{2+} intracelular (Herrera et al., 2010; Hill-Eubanks et al., 2011). Al no haber encontrado diferencias entre las características histomorfométricas con el grupo control, se puede especular que esta mayor capacidad contráctil se deba a un cambio funcional del músculo liso. En cuanto a la respuesta a agentes vasoconstrictores, el grupo sildenafil presentó una menor respuesta a 5Ht, mimético de tromboxano y ET-1. Alternativamente, un aumento basal de las vías vasodilatadoras podría estar oponiéndose a la respuesta vasoconstrictora, derivando en una menor constricción. Cualquiera sea la

explicación, este efecto podría ser beneficioso en un territorio muy sensible a caídas de oxígeno como el cerebral, manteniendo su alta perfusión.

La vía de señalización NO-GMPc es de suma importancia en la regulación del flujo sanguíneo cerebral, derivando su disfunción en varias alteraciones neurológicas y cerebrovasculares (Faraci & Brian, 1994). PDE5 degrada GMPc en células musculares lisas y nervios (Kruuse et al., 2005; Kruse et al., 2006; Schankin et al., 2010). El NO estimula la GCs e incrementa la GMPc en las células musculares lisas, siendo GMPc un segundo mensajero que modula la actividad de quinasas dependientes de GMPc, fosfodiesterasas y canales iónicos y regula la contractilidad de músculo liso vascular. Sildenafil es un inhibidor de la PDE5 que mejora la disponibilidad de GMPc (Ballard et al., 1998). Durante la hipoxia crónica se produce una disminución de la resistencia de los vasos cerebrales (Gilbert et al., 2003) y por lo que se observa, sildenafil disminuiría aún más la resistencia durante su administración. A pesar de que las miografías se realizaron al menos 20 días después de finalizada la administración de sildenafil, se evidenció una menor respuesta a vasoconstrictores y una mayor vasodilatación dependiente e independiente de endotelio. Esto evidencia un efecto positivo a largo plazo en la función vascular.

Los resultados obtenidos con sildenafil en esta Tesis concuerdan con los obtenidos en arterias pulmonares (Herrera et al., 2008), arterias cerebrales neonatales en un modelo de gestación con crecimiento restringido en corderos (Polglase et al., 2016), así como en el modelo de rata y ratón que también presenta efectos vasodilatadores en arterias cerebrales (Achiron et al., 2018; Li et al., 2007). Sin embargo, en estudios humanos, sildenafil parece no presentar efectos a nivel cerebral (Kruuse et al., 2012; Kruuse et al., 2005).

Por otro lado, el tratamiento con sildenafil fue el único en mostrar un aumento en el estrés oxidativo, lo cual se demostró por el incremento en los niveles de 4HNE. Si bien no es un resultado esperado, y muchos estudios apuntan a su función antioxidante frente a patologías renales, obesidad, Alzheimer, entre otras (Georgiadis et al., 2020; Moon, Park, & Kim, 2019; Nabavi et al., 2019), también se ha reportado este efecto pro-oxidativo con el uso de este fármaco en cerebro de ratón (de Carvalho et al., 2019; Hafez & El-Kazaz, 2020). El mecanismo por el cual se produce este efecto adverso aun es desconocido, pero el trabajo de de Carvalho et al., sugiere que puede existir una interacción entre este fármaco y mediadores colinérgicos, como acetilcolinesterasa y receptores muscarínicos, que promueva el tono nitrérgico y así generar un ambiente de estrés oxidativo y nitrosativo (de Carvalho et al., 2019).

Algunos estudios sugieren que sildenafil podría tener un efecto antirremodelante porque genera vasodilatación y disminuye la inducción mecánica por presión de remodelamiento vascular (Barnett y Machado, 2006; Herrera et al., 2008a; Bae et al., 2016). Sin embargo, aun no se ha evaluado su efecto en circulación cerebral neonatal. La falta de una acción prolongada de sildenafil en la estructura vascular de nuestro modelo podría deberse a que este fármaco tiene una acción aguda y de corta vida media (Herrera et al., 2008). En este estudio, sildenafil se administró solo por los primeros 5 días experimentales, y 3 semanas después de terminado esa administración se evaluó el efecto ex vivo e in vitro de esta Tesis. Por lo tanto, se requieren mas estudios para descubrir si hay un efecto agudo de sildenafil sobre la función y estructura vascular de las ACM.

Triterapia con melatonina, hemina y sildenafil

Las ACM de los animales tratados con triterapia tuvieron una mayor capacidad contractil frente a K^+ , y la respuesta contráctil máxima disminuyó con ET-1, mientras que los demás resultados de la miografía para triterapia no mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlas con el grupo control. Tampoco hay diferencia en el espesor de la capa media o la concentración de α -actina en el análisis morfológico e inmunohistoquímico en este tratamiento. Claramente no se produjo el efecto sinérgico esperado entre los fármacos utilizados como vasodilatadores, antioxidantes y antirremodelantes. De hecho, las respuestas vasoconstrictoras parecieran ser un promedio del efecto de los otros 3 fármacos por separado. Frente a los vasodilatadores tampoco hubo diferencias en la respuesta al compararla con el grupo control.

El análisis histológico de diámetro interno, diámetro externo, grosor de pared, razón lumen/pared y número de núcleos no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos al compararlos con el grupo control. Estudios realizados por Longo et al. (1993), indican que no se presentan diferencias entre los diámetros internos de arterias cerebrales de fetos de oveja sometidos a hipoxia crónica al compararlos con las de los animales normóxicos. De hecho, este y otros estudios en fetos de ovejas (Longo & Pearce, 1998; Gilbert et al., 2003) señalan que no se presenta remodelamiento en arterias cerebrales sometidas a hipoxia, por lo que las ACM de nuestro modelo podría no presentar modificaciones estructurales inducidas por hipoxia. Para confirmar esta posibilidad, se pueden utilizar otros métodos de cuantificación de remodelamiento vascular en futuros estudios, tales como depósito de elastina mediante Van Gieson Elástica (VGE) (Herrera et al., 2014b), tinción de orceína, Weigert de resorcina fucsina, tinción de Verhoeff o técnica de aldehido fucsina de Gomori, además de depósito de colágeno mediante Tricrómico de Mallory o Tricrómico de Masson (Montuenga et al., 2014).

Desafortunadamente no se dispuso de un grupo de neonatos de tierras bajas para comparar nuestros resultados, aspecto que queda pendiente para futuros estudios. El hecho de no existir remodelamiento de las ACM, podría implicar la imposibilidad de esperar un efecto antirremodelante inducido por hemina tanto en el grupo H como en el grupo MHS, ni tampoco un efecto indirecto de melatonina al disminuir el estrés oxidativo que induce remodelamiento. Esto concuerda también con que no se observen diferencias en la inmunohistoquímica de α -actina que es un indicador de remodelamiento.

Frente a la hipoxia crónica, la respuesta hemodinámica fetal permite que el flujo sanguíneo al territorio encefálico se mantiene en niveles prácticamente normales en los fetos de oveja, lo que, sumado al aumento de la hemoglobina, permite una oxigenación normal de este territorio (Kamitomo et al., 1993). Por lo tanto, la hipoxia a nivel de las ACM no sería lo suficientemente severa en estos animales para generar estrés oxidativo y/o grandes alteraciones de la función y estructura vascular. Respecto a la expresión de eNOS, no se observaron diferencias. Se describe que hipoxia crónica disminuye la expresión de eNOS en arterias cerebrales fetales de oveja (Aguan et al., 1998) y neonatas de rata (Tang et al., 2017). A la vez, hipoxia crónica podría disminuir la función de eNOS en arterias pulmonares neonatas de oveja (Liu et al., 2009; Herrera et al., 2008b), sin embargo en el presente estudio, ninguno de los tratamientos demostró tener un efecto reestableciendo su expresión.

Existe la posibilidad que los tratamientos demuestren su efectividad mientras sean administrados y que la respuesta vasodilatadora se pueda registrar in vivo. De hecho, en los estudios previos donde se utilizó melatonina y hemina en corderos, se efectuó una evaluación de la estructura y función vascular inmediatamente terminado el tratamiento, donde se evidenciaron importantes efectos vasculares en pulmón y carótida (Herrera et al., 2014; Torres et al., 2015; Ebensperger, 2011). En nuestro estudio, los animales se mantuvieron de 1-3 semanas después de terminada la administración del fármaco, para poder evaluar la mantención del efecto. En este período de tiempo, pudo haberse revertido, incluso empeorado la función vascular debido al fenómeno de efecto “rebote”. Esto ocurre debido al desbalance vasoactivo que puede generar la administración exógena de un agente vasoactivo (Taguchi et al., 2018). Lamentablemente, este modelo experimental no permite poder evaluar la función vascular a diferentes tiempos para así definir los cambios temporales que presentan las ACM a lo largo del tratamiento.

Dentro de las limitaciones que se pueden considerar en este estudio se encuentra el no contar con un grupo en tierras bajas de corderos gestados y nacidos en

normoxia, para poder comparar si existen cambios significativos entre ellos y el grupo control de este estudio. Otra limitación es el período de evaluación ex vivo e in vitro que no permiten una caracterización de las respuestas en el tiempo de tratamiento y post-tratamiento. Finalmente, y por el período en que se desarrollo esta Tesis (2019-2020), las contingencias sociales nacionales y la pandemia COVID-19 limitaron el desarrollo de muchos experimentos que requieren presencialidad en el Laboratorio. A pesar de lo anterior, esta Tesis entrega importante información de los efectos que tienen los fármacos evaluados sobre la función y estructura vascular de las ACM.

CONCLUSIÓN

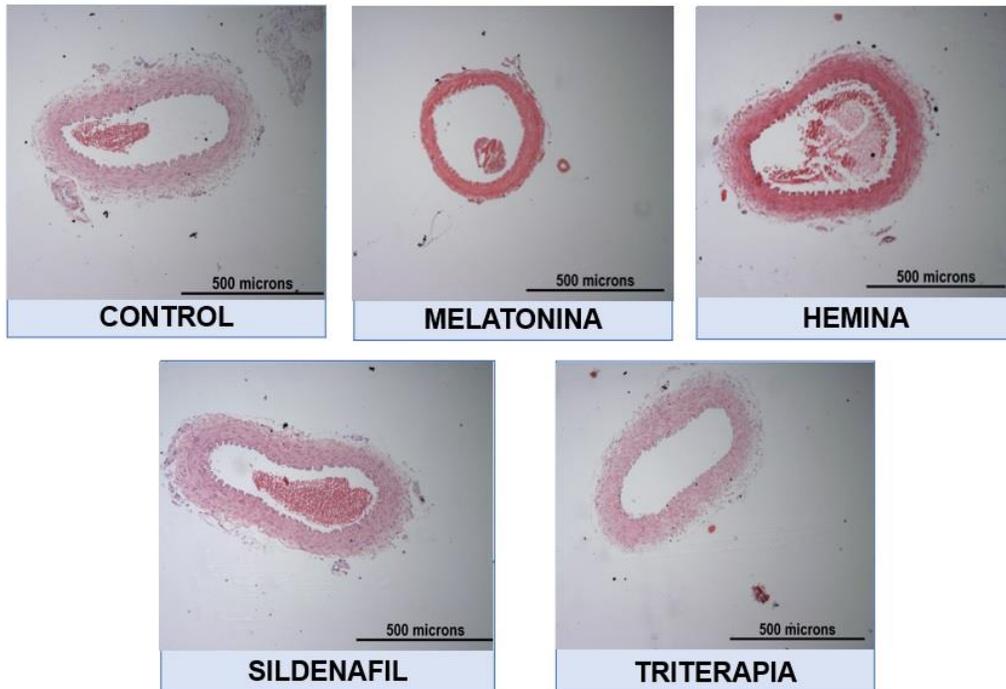
Los tratamientos propuestos no parecieran tener los efectos positivos esperados sobre la función vasoactiva de las arterias cerebrales medias, al menos 1-3 semanas después de haber terminado el tratamiento. Sin embargo, se debe considerar que tampoco se evidencia un efecto negativo en dichas arterias. Desde este punto de vista, este tratamiento fue inicialmente propuesto para tratar la HAPN sin alterar otros territorios vasculares (Herrera, 2015; González-Candia et al., 2020).

Además, los estudios de seguridad farmacéutica desarrollados en el Laboratorio, demostraron la inocuidad de la triterapia evaluada en esta tesis (González, 2020). Por lo tanto, el hecho de que no se aprecien efectos importantes en la circulación cerebral es deseable si este tratamiento es dirigido para la HAPN. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder determinar de forma más precisa la implicancia que tiene el uso de estos fármacos en la circulación cerebral en sus efectos agudos (durante la administración farmacológica), pudiendo considerarse estos resultados en futuros usos de melatonina, sildenafil o hemina en la vida neonatal.

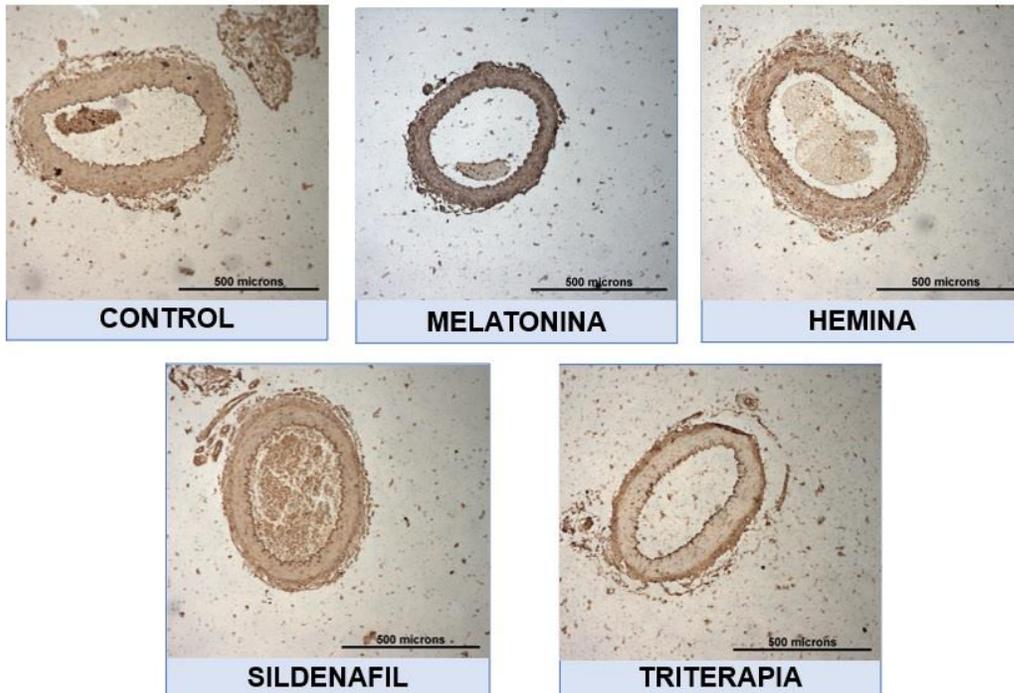
ANEXO.

Imágenes representativas de ACM.

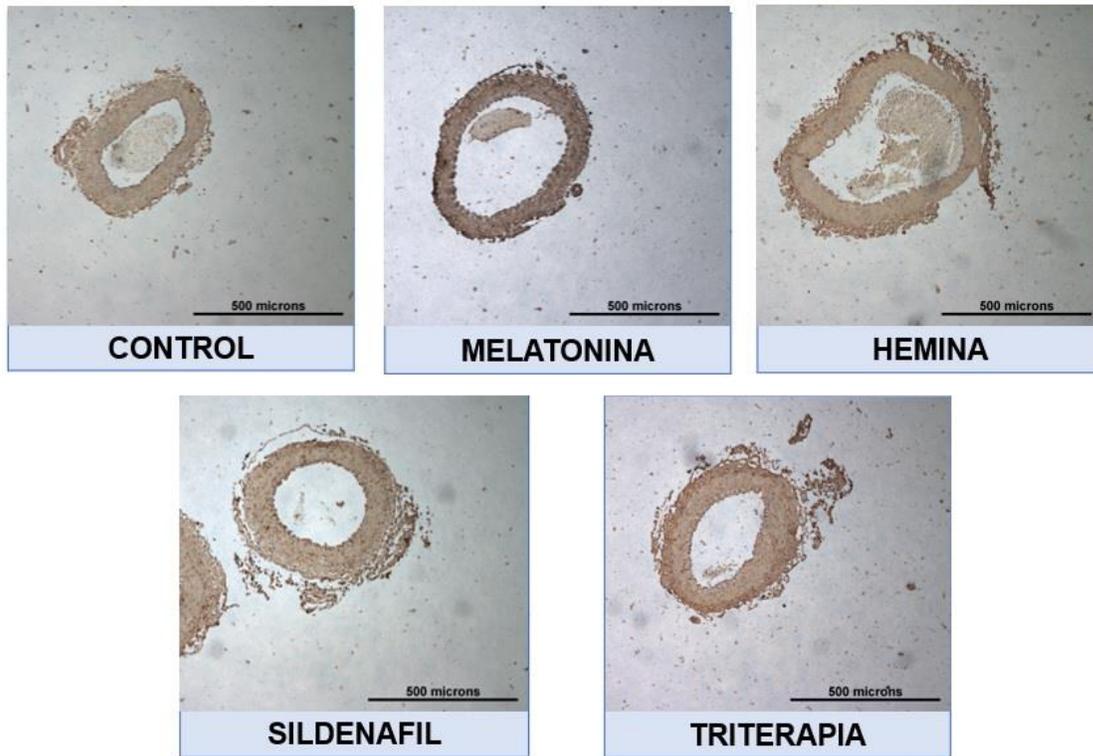
1. Tinción Hematoxilina – Eosina.



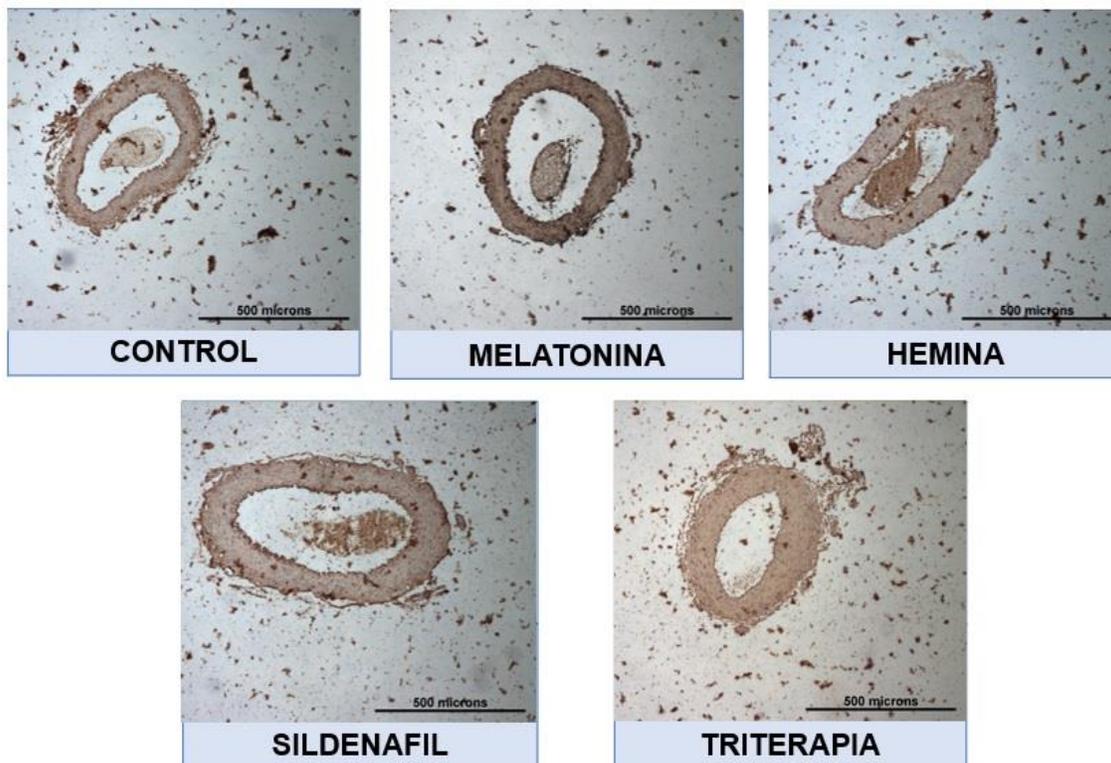
2. Inmunohistoquímica para eNOS.



3. Inmunohistoquímica para α -actina.



4. Inmunohistoquímica para 4HNE.



REFERENCIAS

Abraham N.G., Kappas A. (2011). Mechanism of heme-heme oxygenase system impairment of endothelium contraction in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 58(5): 772-773.

Achiron A., Hecht I., Juza C., Barak A., Burgansky-Eliash Z. (2018). The effect of sildenafil on retinal blood velocity in healthy subjects. *Eye Vis (Lond)*. 5(5): 30.

Aguan K., Murotsuki J., Gagnon R., Thompson L.P., Weiner C.P. (1998). Effect of chronic hypoxemia on the regulation of nitric-oxide synthase in the fetal sheep brain. *Dev Brain Res*. 111: 271–277.

Allison B.J., Brain K.L., Niu Y., Kane A.D., Herrera E.A., Thakor A.S., Botting K.J., Cross C.M., Itani N., Skeffington K.L., Beck C., Giussani D.A. (2016). Fetal in vivo continuous cardiovascular function during chronic hypoxia. *J Physiol*. 594(5):1247–1264.

Anderson P.A., Glick K.L., Killam A.P., Mainwaring R.D. (1986). The effect of heart rate on in utero left ventricular output in the fetal sheep. *J Physiol*. 372: 557–573.

Andresen J.J., Shafi N., Robert M., Bryan R. (2006a). Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 100(1): 318–327.

Andresen J.J., Shafi N., Durante W., Bryan R. (2006b). Effects of carbon monoxide and heme oxygenase inhibitors in cerebral vessel of rats and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(1): H223-H230.

Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 55: 373–399.

Aversa S., Pellegrino S., Barberi I., Reiter R.J., Gitto E. (2012). Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 25(3): 207–221.

Baburamani A.A., Lo C., Castillo-Melendez M., Walker D.W. (2013). Morphological evaluation of the cerebral blood vessels in the late gestation fetal sheep following hypoxia in utero. *Microvasc Res*. 85: 1-9.

Bae H.K., Lee H., Kim K.C., Hong Y.M. (2016). The effect of sildenafil on right ventricular remodeling in a rat model of monocrotaline-induced right ventricular failure. *Korean J Pediatr.* 59(6): 262-270.

Ballard S.A., Gingell C.J., Tang K., Turner L.A., Price M.E., Naylor A.M. (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol.* 159(6): 2164–2171.

Barkoudah E., Jaggar J.H., Leffler C.W. (2004). The permissive role of endothelial NO in Co-induced cerebrovascular dilatation. *Am J Physiol Circ Physiol.* 287: H1459-H1465.

Barnett C.F., Machado R.F. (2006). Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2(4): 411-22.

Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. (2016a). Electrical activity of the brain, sleep- wake state & circadian rhythms. *En: Ganong's, Review of Medical Physiology.* 25^a Ed. MC Graw Hill. 269-282.

Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. (2016b). Transport & metabolic functions of the liver. *En: Ganong's, Review of Medical Physiology.* 25^a Ed. MC Graw Hill. 507- 518.

Barret K., Barman S., Boitano S., Brooks H. (2016c). Cardiovascular regulatory mechanisms. *En: Ganong's, Review of Medical Physiology.* 25^a Ed. MC Graw Hill. 585- 599.

Bennet L., Booth L.C., Drury P.P., Quaedackers J.S., Gunn A.J. (2012). Preterm neonatal cardiovascular instability: does understanding the fetus help evaluate the newborn? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 39: 965-972.

Beñaldo F., Ferrada J., Castillo S., Ebensperger G. (2017). Mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar neonatal. Una perspectiva molecular. *Rev Chil Enferm Respir.* 33(4): 308-315.

Blood A.B., Hunter C.J., Power G.G. (2003). Adenosine mediates decreased cerebral metabolic rate and increased cerebral blood flow during acute moderate hypoxia in the near-term fetal sheep. *J Physiol.* 553: 935–945.

Bracci R., Buonocore G. (1998). The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants. *Semin Neonatol.* 3: 191-197.

Breitenstein S., Roessig L., Sandner P., Lewis K.S. (2016). Novel sGC stimulators and sGC activators for the treatment of heart failure. *Handb Exp Pharmacol.* 243: 225–247.

Brian Jr.J.D., Heistad D.D., Faraci F.M. (1994). Effect of carbon monoxide on rabbits cerebral arteries. *Stroke.* 25(3): 639- 643.

Boddy K., Dawes G.S., Fisher R., Pinter S., Robinson J.S. (1974). Foetal respiratory movements, electrocortical and cardiovascular responses to hypoxaemia and hypercapnia in sheep. *J Physiol.* 243(3): 599–618.

Bonnefont-Rousselot D., Collin F., Jore D., Gardès-Albert M. (2011). Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro. *J Pineal Res.* 50(3), 328–335.

Buonocore G., Groenendaal F. (2007). Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med.*12(4): 287-295.

Cao F.W. (2015). Trastorno del flujo sanguíneo y la presión arterial. *En: Fundamentos de Fisiopatología.* Porth. 4° Ed. Wolters Kluwer. 402-443.

Carratu P., Pourcyrus M., Fedinec A., Leffler C.W., Parfenova H. (2003). Endogenous heme oxygenase prevents impairment of cerebral vascular functions caused by seizures. *Am J Physiol Circ Physiol.* 285(3): H1148-H1157.

Chucharoen P., Chetsawang B., Putthaprasart C., Srikiatkhachorn A., Govitrapong P. (2007). The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J Pineal Res.* 43(1): 35–41.

Clanton T.L. (2007). Hypoxia – induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 102(6): 2379 – 2388.

Cochius - den Otter S. C. M., Kipfmueller F., de Winter B.C.M., Allegaert K., Tibboel D., Mueller A., Koch B.C.P. (2020). Pharmacokinetic modeling of intravenous sildenafil in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Clin Pharmacol.* 76(2), 219–227.

Cohen W.R., Piasecki G.J., Jackson B.T. (1982). Plasma catecholamines during hypoxemia in fetal lamb. *Am J Physiol.* 243(5): R520–525.

Cook J.S., Sauder C.I., Ray C.A. (2011). Melatonin differentially affects vascular blood flow in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300(2): H670- H674.

Couto G., Nelson R. (2010). Pruebas diagnósticas para las vías respiratorias bajas. *En: Medicina interna de pequeños animales.* 4ª Ed. Elsevier Mosby. pp 252-284.

Das R., Balonan L., Ballard H.J., Ho S. (2008). Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery. *Int J Cardiol.* 126(3): 340–345.

de Carvalho M.A.J., Chaves-Filho A., de Souza A.G., de Carvalho Lima C.N., de Lima K.A., Rios Vasconcelos E.R., de França Fonteles M.M. (2019). Proconvulsant effects of sildenafil citrate on pilocarpine-induced seizures: involvement of cholinergic, nitrergic and pro-oxidant mechanisms. *Br Res Bull.* 149(7), 60–74.

Dorey E.S., Pantaleon M., Weir K.A., Moritz K.M. (2014). Adverse prenatal environment and kidney development: implications for programming of adult disease. *Reproduction.* 147(6): R189–198.

Dowling D.K., Simmons L.W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci.* 276(16663): 1737–1745.

Ebensperger G. (2011). Rol del sistema hemoxigenasa-monóxido de carbono en la regulación del tono y el remodelamiento vascular pulmonar del recién nacido de oveja crónicamente hipóxico. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile.

Ewing J., Maines M. (1997). Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein and mRNA expression in rat brain. *Brain Res.* 1: 165-174.

Farías J.F., Herrera E.A., Carrasco-Pozo C., Sotomayor-Zárate R., Cruz G., Morales P., Castillo R.L. (2016). Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 158: 1–23.

Faraci F.M., Brian Jr., J.E. (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke.* 25: 692–703.

Fletcher A.J., Gardner D.S., Edwards C.M.B, Fowden A.L., Giussani D.A. (2006). Development of the ovine fetal cardiovascular defense to hypoxemia towards full term. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(6): H3023–H3034.

Floyd R.A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 4(9): 2587–2597.

Foresti R., Hammad J., Clark J.E., Johnson T.R., Mann B.E., Friebe A., Green C.J., Motterlini R. (2004). Vasoactive properties of CORM-3 a novel water- soluble carbon monoxide releasing molecule. *Br J Pharmacol*. 142(3): 453-460.

Fredenburgh L., Perella M., Mitsialis S. (2007). The role of heme oxygenase -1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 361 (2): 158-65.

Frosch M., Anthony D., De Girolami V. (2015). Sistema Nervioso Central. *En: Robin y Cotran Patología estructural y funcional*. 9° Ed. Elsevier Saunders. pp 1319-1344.

Geary G., Krause N., Duckles S. (1997). Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol*. 273(3):H1530-H1536.

Georgiadis G., Zisis I.-E., Docea A.O., Tsarouhas K., Fragkiadoulaki I., Mavridis C., Karavitakis M., Stratakis S., Stylianou K., Tsitsimpikou C., Calina D., Sofikitis N., Tsatsakis A., Mamoulakis C. (2020). Current concepts on the reno-protective effects of phosphodiesterase 5 inhibitors in acute kidney injury: Systematic Search and Review. *J Clin Med*. 9(5):1284.

Gilbert R.D, Pearce W.J, Longo L.D. (2003). Fetal cardiac and cerebrovascular acclimatization responses to high altitude, longterm hypoxia. *High Alt Med Biol*. 4(2):203–213.

Girouard H., Chulak C., Lejossec M., Lamontagne D., de Champlain J. (2001). Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 19(8):1369-1377.

Giussani D. A. (2016). The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological Mechanisms. *J Physiol*. 594(5):1215–1230.

Giussani D.A., Spencer J.A., Moore P.J., Bennet L., Hanson M.A. (1993). Afferent and efferent components of the cardiovascular reflex responses to acute hypoxia in term fetal sheep. *J Physiol.* 461:431–449.

Giussani D.A., Moore P.J., Bennet L., Spencer J.A., Hanson M.A. (1995). α 1- and α 2 adrenoreceptor actions of phentolamine and prazosin on breathing movements in fetal sheep in utero. *J Physiol.* 486: 249–255.

Giussani D.A., Salinas C.E., Villena M. Blanco C.E. (2007). The role of oxygen in prenatal growth: studies in the chick embryo. *J Physiol.* 585: 911–917.

Giussani D.A., Camm E.J., Niu Y., Richter H.G., Blanco C.E., Gottschalk R., Blake E.Z., Horder K.A., Thakor A.S., Hansell J.A., Kane A.D., Wooding F.B., Cross C.M., Herrera E.A. (2012). Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One.* 7(2): e31017.

Gong, L. M., Du, J. B., Shi, L., Shi, Y., & Tang, C. S. (2004). Effects of endogenous carbon monoxide on collagen synthesis in pulmonary artery in rats under hypoxia. *Life Sciences*, 74(10), 1225–1241. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.046>

Gonzalez-Candia A., Veliz M., Carrasco-Pozo C., Castillo R.L, Cárdenas J.C., Ebensperger G., Reyes R.V., Llanos A.J., Herrera E.A. (2019). Antenatal melatonin modulates an enhanced antioxidant/pro-oxidant ratio in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Redox Biol.* 22: 101128.

Gonzalez-Candia A., Candia A.A., Figueroa E.G., Feixes E., Gonzalez-Candia C., Aguilar S.A., Ebensperger G., Reyes R.V., Llanos A.J., Herrera E.A. (2020). Melatonin long lasting beneficial effects on pulmonary vascular reactivity and redox balance in chronic hypoxic ovine neonates. *J Pineal Res.* 68 (1): e12613.

Gonzalez-Candia A. (2019). Efecto de melatonina y hemina como tratamiento antioxidante y antirremodelante para la hipertensión pulmonar en neonatos de oveja gestados en hipoxia crónica. Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacología, Universidad de Chile.

Gonzalez C. (2020). Efecto cardiopulmonar y seguridad farmacéutica de una triterapia compuesta por melatonina, hemina y sildenafil, como tratamiento para la hipertensión pulmonar neonatal en un modelo de ovejas gestadas y nacidas en hipoxia crónica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad Andrés Bello.

Gopinathan V., Miller N.J., Milner A.D., Rice-Evans C.A. (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett.* 349(2):197-200.

Goto K., Ohtsubo T., Kitazono T. (2018). Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: the role of endothelial ion channels. *Int J Mol Sci.* 19(1): 315.

Gitto E., Marseglia L., Manti S., D'Angelo G., Barberi I., Salpietro C., Reiter R.J. (2013). Protective role of melatonin in neonatal disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013: 980374.

Grossini E., Molinari C., Uberti F., Mary D. A. S. G., Vacca G., Caimmi P. P. (2011). Intracoronary melatonin increases coronary blood flow and cardiac function through β -adrenoreceptors, MT1/MT2 receptors, and nitric oxide in anesthetized pigs. *J Pineal Res.* 51(2), 246–257.

Gunn A.J., Bennet L. (2009). Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models. *Clin Perinatol.* 36(3): 579–593.

Guyton A., Hall J. (2006). Reproductive and hormonal functions of the male (and function of the pineal gland). *En: Textbooks of Medical physiology.* 11^a Ed. Elsevier Saunders. pp 996-1010.

Hafez M. H., El-Kazaz S.E. (2020). The impact of phosphodiesterase-5 inhibitor (sildenafil citrate) on some hippocampal neurotransmitters, oxidative stress status, minerals, and anxiety-like behavior in rats. *J Adv Vet Anim Res.* 7(2), 281–289.

Herrera E.A., Pulgar V.M., Riquelme R.A., Sanhueza E.M., Reyes R.V., Ebensperger G., Parer J.T., Váldez E.A., Giussani D.A., Blanco C.E., Llanos A.J. (2007). High altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol.* 292: R2234 – R2240.

Herrera E.A., Ebensperger G., Krause B.J., Riquelme R.A., Reyes R.V., Capetillo M., González S., Parer J.T., Llanos A.J. (2008a). Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep. *Pediatr Res.* 63(2): 169-175.

Herrera E.A., Reyes R.V., Giussani D.A., Riquelme R.A., Sanhueza E.M., Ebensperger G., Casanello P., Mendez N., Ebensperger R., Sepúlveda-Kattan E., Pulgar V.M., Cabello G., Blanco C.E., Hanson M.A., Parer J.T., Llanos A.J. (2008b). Carbon monoxide a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the andean altiplano. *Cardiovasc Res.* 77: 197-201.

Herrera E.A., Verkerk M.M., Derks J.B., Guissani D.A. (2010). Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocortical therapy in rats. *PLoS One*. 5(2):e9250.

Herrera E.A., Krause B., Ebensperger G., Reyes R., Casanello P., Parra-Cordero M., Llanos A. (2014a). The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. *Front Pharmacol*. 5: 149.

Herrera E.A., Machiavello R., Montt C., Ebensperger G., Díaz M., Ramírez S., Parer J., Serón-Ferré M., Reyes R., Llanos A. (2014b). Melatonin improves cerebrovascular function and decreases oxidative stress in chronically hypoxic lambs. *J Pineal Res*. 57(1):33-42.

Herrera E.A. (2015). To be born high and flat (Andean Altiplano): healing vascular function and pulmonary arterial hypertension by a combined treatment in neonatal lambs. Concurso FONDECYT Regular (Marco teórico).

Herrera E.A., Farías J.G., Ebensperger G., Reyes R.V., Llanos A.J., Castillo R.L. (2015). Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: a tale of two exposures. *Pharmacol Res*. 101:94-101.

Herrera E.A., González-Candia A. (2020). Comment on Melatonin as a potential adjuvant treatment for COVID-19. *Life Sci*. 253:117739.

Hill-Eubanks D.C., Werner M.E., Heppner T.J., Nelson M.T. (2011). Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(9):a004549.

Holt D.C., Fedinec A.L., Vaughn A.N., Leffler C.W. (2007). Age and species dependence of pial arteriolar response to topical carbon monoxide in vivo. *Exp Biol Med*. 232(11): 1465- 1469.

Hunter C.J., Blood A.B., White C.R., Pearce W.J., Power G.G. (2003) Role of nitric oxide in hypoxic cerebral vasodilatation in the ovine fetus. *J Physiol*. 549:625–633.

Jaggar J.H., Leffler C.W., Cheranov S.Y., Tcheranova D., Shuyu E., Cheng X. (2002). Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca²⁺ sparks to Ca²⁺ activated K⁺ channels. *Circ Res*. 91:610-617.

Jensen A., Garnier Y., Berger R. (1999). Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 84(2):155–172.

Jeon E.M., Choi H.C., Lee K.Y., Chang K.C., Kang Y.J. (2009). Hemin inhibits hypertensive rat vascular smooth muscle cell proliferation through regulation of cyclin D and p21. *Arch Pharm Res.* 32(3):375-382.

Johnson F.K., Johnson R.A. (2003). Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285(3): R536-R541.

Kamitomo M., Alonso J.G., Okai T., Longo L.D., Gilbert R.D. (1993). Effects of long-term, high-altitude hypoxemia on ovine fetal cardiac output and blood flow distribution. *Am J Obstet Gynecol.* 169(3):701–707.

Kane A.D., Hansell J.A., Herrera E.A., Allison B.J., Niu Y., Brain K.L., Kaandorp J.J., Derks J.B., Giussani D.A. (2014). Xanthine oxidase and the fetal cardiovascular defence to hypoxia in late gestation ovine pregnancy. *J Physiol.* 592: 475–489.

Katusic Z.S. (1996). Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med.* 20: 443–448.

Kaur C., Sivakumar V., Ling E. A. (2010). Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res.* 48(3):185–193.

Kaur C., Sivakumar V., Robinson R., Foulds W.S., Luu C.D., Ling E.A. (2013). Neuroprotective effect of melatonin against hypoxia-induced retinal ganglion cell death in neonatal rats. *J Pineal Res.* 54(2):190–206.

Knecht K.R., Milam S., Wilkinson D.A., Fedinec A.L., Leffler C.W. (2010). Time-dependent action of carbon monoxide on the newborn cerebrovascular circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(1):H70-H75.

Koneru P., Leffler C.W. (2004). Role of cGMP in carbon monoxide – induced cerebral vasodilation in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(1):H304-H309.

Konukoglu D., Uzun H. (2016). Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 956: 511-540.

Kruse L.S, Sandholdt N.T.H., Gammeltoft S., Olesen J., Kruuse C. (2006). Phosphodiesterase 3 and 5 and cyclic nucleotide-gated ion channel expression in rat trigeminovascular system. *Neurosci Lett.* 404(1-2):202–207.

Kruuse C., Khurana T.S, Rybalkin S.D., Birk S., Engel U., Edvinsson L., Olesen J. (2005). Phosphodiesterase 5 and effects of sildenafil on cerebral arteries of man and guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 521(1-3):105–114.

Kruuse C., Gupta S., Nilsson E., Kruse L., Edvinsson L. (2012). Differential vasoactive effects of sildenafil and tadalafil on cerebral arteries. *Eur J Pharmacol.* 674(2-3):345–351.

Kumar D., Bhaskaran M., Alagappan L., Tori D., Yadav I., Konkimalla S., Magoon S., Singhal P.C. (2010). Heme oxygenase -1 modulates mesangial cell proliferation by p21 Waf1 upregulation. *Ren Fail.* 32(2):254-258.

Kumar V, Abbas A., Aster J. (2015). Respuestas celulares al estrés y las agresiones tóxicas: adaptación, lesión y muerte. *En: Robin y Cotran. Patología estructural y funcional.* 9° ED. Elsevier Saunders. pp 31-68.

Kwon K.J., Kim J.N., Kim M.K., Lee J., Ignarro L.J., Kim H.J., Shin C.Y., Han S.H. (2011). Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: a possible role in neuroprotection. *J Pineal Res.* 50: 110–123.

Lara J. (2014). Estrés oxidativo, disfunción endotelial y aterosclerosis. *An Fac Med.* 175(4): 351-352.

Leffler C., Parfenova H., Jaggar J., Wang R. (2006a). Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messenger in cerebrovascular circulation. *J Appl Physiol.* 100(3): 1065-1076.

Leffler C., Parfenova H., Fedinec A., Basuroy S., Tcheranova D. (2006b). Contributions of astrocytes and CO to pial arteriolar dilation to glutamate in newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(6): H2897- H2904.

Li L., Jiang Q., Zhang L., Ding G., Gang Zhang Z., Li Q., Ewing J.R., Lu M., Panda S., Ledbetter K.A., Whitton P.A. Chopp M. (2007). Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke. *Brain Res.* 1132(1), 185–192.

Li Y., Gonzalez P., Zhang L. (2012). Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog Neurobiol.* 98:145–165.

Li Z., Wang Y., Vanhoutte P.M. (2011). Upregulation of heme oxygenase 1 by hemin impairs endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 58(5): 926-34.

Limesand S.W., Jensen J., Hutton J.C. Hay W.W. Jr. (2005). Diminished β -cell replication contributes to reduced β -cell mass in fetal sheep with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288: R1297–1305.

Liu J., Gao Y., Negash S., Longo L.D., Raj J.U. (2009). Long-term effects of prenatal hypoxia on endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296: L547–L554, 2009.

Llanos A.J., Ebensperger G., Herrera E.A., Reyes R.V., Cabello G., Díaz M., Giussani D.A., Parer J.T. (2012). The heme oxygenase – carbon monoxide system in the regulation of cardiorespiratory function at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol.* 184: 186-191.

Longo L.D., Pearce W.J. (1998). High altitude, hypoxic- induced modulation of noradrenergic-mediated responses in fetal and adult cerebral arteries. *Comp Biochem Physiol.* 119A: 683–694.

Longo L.D., Hull A.D., Long D., Pearce W.J. (1993). Cerebrovascular adaptations to high-altitude hypoxemia in fetal and adult sheep. *Am J Physiol.* 264: R65–R72.

Low J.A., Galbraith R.S., Muir D.W., Killen H.L., Pater E.A., Karchmar E.J. (1985). The relationship between perinatal hypoxia and newborn encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol.* 152: 256–260.

Lüneburg N., Siques P., Brito J., Arriaza K., Pena E., Klose H., Leon-Velarde F., Böger R.H. (2016). Long-term chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats causes an imbalance in the asymmetric dimethylarginine/nitric oxide pathway and ROS activity: a possible synergistic mechanism for altitude pulmonary hypertension? *Pulm. Med.* 2016: 6578578.

Maines M. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37: 517-554.

Masana M., Doolen S., Ersahin C., Al-Ghoul W., Duckles S.P., Dubocovich M.L., Krause D.N (2002). MT (2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 302(3): 1295-302.

Matlung H.L., Bakker E.N., VanBavel E. (2009). Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxid Redox Signal.* 11(7): 1699-709.

Mauricio M.D., Segarra G., Medina P., Aldasoro M., Martinez-Leon J.B., Vila J.M. (2006). Relaxation and cyclic GMP levels in response to sildenafil in human pulmonary arteries from donors. *Eur J Pharmacol.* 530: 259–262.

Maxted A., Hill A., Davies P. (2013). Oral sildenafil as a rescue therapy in presumed acute pulmonary hypertensive crisis. *Pediatrics.* 131(2): e626-8.

Meng L., Gelb A.W. (2014). Regulation of cerebral autoregulation by carbon dioxide. *Anesthesiol.* 122: 196-205.

Michaeli J., Srebnik N., Zilberstein Z., Rotem R., Bin-Nun A., Grisaru-Granovsky S. (2020). Intrapartum fetal monitoring and perinatal risk factors of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. *Arch Gynecol Obstet.* 302 (9).

Miller S., Wallace E., Walker D. (2012). Antioxidant therapies: A potential role in perinatal medicine. *Neuroendocrinol.* 96: 13-23.

Mitchell R. (2015). Vasos sanguíneos. En: Robin y Cotran. Patología estructural y funcional. 9° Ed. Elsevier Saunders. pp 483-522.

Montuenga L., Bodegas M., de Andrea C., Esteban F., (2014). Tecnicas de tinción en histología. En: Tecnicas en Histología y Biología Celular. 2ª Ed. Montuenga L. 61-84.

Moon K.H., Park S.Y., Kim Y.W. (2019). Obesity and erectile dysfunction: From bench to clinical implication. *World J Men Health.* 37(2), 138–147.

Motterlini R., Otterbein L. (2010). The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov.* 9(9): 728-43.

Mulvany M.J. (1999). Vascular remodeling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res.* 41: 9 –13.

Münzel T., Daiber A., Ullrich V., Mülsch A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the sGC and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 1551-1557.

Murray F., Maclean M.R., Insel P.A. (2011). Role of phosphodiesterases in adult-onset pulmonary arterial hypertension. *Handb Exp Pharmacol.* 204: 279-305.

Nabavi S. M., Talarek S., Listos J., Nabavi S. F., Devi K. P., Roberto de Oliveira M., Farzaei M.H. (2019). Phosphodiesterase inhibitors say NO to Alzheimer's disease. *Food Chem Toxicol.* 134(9), 110822.

Naik J., O'Donoghue T., Walker B. (2003). Endogenous carbon monoxide is an endothelial – derived vasodilator factor in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: H838- H845.

Naik J., Walker B. (2003). Heme oxygenase- mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H220-H228.

Nishida N., Blood A.B., Hunter C.J., Bragg S., Williams J., Pearce W.J., Power G.G. (2006). Role of prostanoids in the regulation of cerebral blood flow during normoxia and hypoxia in the fetal sheep. *Pediatr Res.* 60: 524–529.

Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. (2006). Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273: 2813–2838.

Pauvert O., Bonnet S., Rousseau E., Marthan R., Savineau J.P. (2004). Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287: L577–L583.

Pawlina W. (2016). Órganos endocrinos. En: Ross. *Histología texto y atlas, correlación con biología molecular y celular.* 7° ED. Wolters Kluwer. pp 799-848.

Pearce W. (2006). Hypoxic regulation of the fetal cerebral circulation. *J Appl Physiol.* 100: 731–738.

Pérez-Torres I., Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz M.E. (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro- oxidant effect of antioxidant agents. *Int J Mol Sci.* 18: 2098.

Pfister S.L. (2008). Characterization of endothelial thromboxane receptors in rabbit aorta. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 87: 54–61

Poggi C., Dani C. (2014). Antioxidant strategies and respiratory disease of the preterm newborn: an update. *Oxid Med Cell Long.* 2014: 721043.

Polglase G.R., Allison B.J., Coia E., Li A., Jenkin G., Malhotra A., Sehgal A., Kluckow M., Gill A.W., Hooper S.B., Miller S.L. (2016). Altered cardiovascular function at birth in growth-restricted preterm lambs. *Pediatr Res* 80(4): 538-546.

Porth C. (2015). Respuestas celulares al estrés, la lesión y el envejecimiento. En: *Fundamentos de Fisiopatología.* 4° ED. Wolters Kluwer. pp 31-48.

Pouysségur J., Mechta-Grigoriou F. (2006). Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem.* 387(10-11): 1337-46.

Randhawa P.K., Gupta M.K. (2020). Melatonin as a protective agent in cardiac ischemia-reperfusion injury: vision/Illusion? *Eur J Pharmacol.* 885(8), 173506.

Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 50: 1129–1146.

Reiter R.J., Tan D.X., Paredes S.D., Fuentes-Broto L. (2010). Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med.* 42(4): 276-85.

Rodrigo J., Fernandez A.P., Serrano J., Peinado M.A., Martinez A. (2005). The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39: 26–50.

Rurak D.W., Gruber N.C. (1983). Increased oxygen consumption associated with breathing activity in fetal lambs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 54, 701–707.

Rybalkin S.D., Yan C., Bornfeldt K.E., Beavo J.A. (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 93: 280–291.

Salinas C.E., Blanco C.E., Villena M., Camm E.J., Tuckett J.D., Weerakkody R.A., Kane A.D., Shelley A.M., Wooding F.B., Quy M., Giussani D.A. (2010). Cardiac and

vascular disease prior to hatching in chick embryos incubated at high altitude. *J Dev Orig Health Dis.* 1, 60–66.

Samiee - Zafarghandy S., Smith P., Van den Anker J. (2014). Safety of sildenafil in infants. *Pediatr Crit Care Med.* 15(4): 362-8.

Sánchez M., Roca J., Garcia-Navarro C., Molins L. (2016). Neumología, Métodos diagnósticos. En: Rozman C, Farreras. Medicina interna. 18ª Ed. Elsevier. pp 634-643.

Saugstad O.D. (2005). Oxidative stress in the newborn: a 30-year perspective. *Biol Neonate.* 88: 228–236.

Schankin C.J., Kruse L.S., Reinisch V.M., Jungmann S, Kristensen J.C., Grau S., Ferrari U., Sinicina I., Goldbrunner R., Straube A., Kruuse C. (2010). Nitric oxide-induced changes in endothelial expression of phosphodiesterases 2, 3, and 5. *Headache* 50: 431–441.

Schwer C.I., Mutschaler M., Stoll P., Goebel U., Humar M., Hoetzel A., Schmidt R. (2010). Carbon monoxide releasing molecule -2 inhibits pancreatic stellate cell proliferation by activating p38 mitogen-activated protein kinase/heme oxygenase-1 signaling. *Mol Pharmacol.* 77(4): 660-9.

Semenza G.L. (2006). Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol.* 91: 803–806.

Semenza G.L., Wang G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 12: 5447–5454.

Sheng M., Lu H., Liu P., Li Y., Ravi H., Peng S.L., Diaz - Arrastia R., Devous M.D., Womack K.B. (2017). Sildenafil improves vascular and metabolic function in patients with alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 60(4): 1351-1364.

Simon-Tillaux N., Lecarpentier E., Tsatsaris V., Hertig A. (2019). Sildenafil for the treatment of preeclampsia, an update: should we still be enthusiastic? *Nephrol Dial Transplant.* 34(11), 1819–1826.

Smyth E.M. (2010). Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol.* 5: 209–219.

Soria R., Julian C.G., Vargas E., Moore L.G., Giussani D.A. (2013). Graduated effects of high-altitude hypoxia and highland ancestry on birth size. *Pediatr Res.* 74: 633–638.

Steinhorn R., Kinsella J., Pierce C., Butrous G., Dillen M., Oakes M., Wessel D. (2009). Intravenous sildenafil in the treatment of neonates with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr.* 155 (6): 841-847.

Steinhorn R. (2013). Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension in infancy. *Early Hum Dev.* 89(11): 865-74.

Stulz J., Puthoff T., Backes C., Nahata M.C. (2013). Intermittent intravenous sildenafil for pulmonary hypertension management in neonates and infants. *Am J Health Syst Pharm.* 70(5): 407-13.

Sutton H.C., Winterbourn C.C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med.* 6: 53e60.

Sylvester J.T., Shimoda L.A., Aaronson P.J., Ward J.P. (2012). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev.* 92(1): 367–520.

Tabima D.M., Frizzell S., Gladwin M.T. (2012). Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med.* 52(9):1970-86.

Taguchi K., Bessho N., Hasegawa M., Narimatsu H., Matsumoto T., Kobayashi T. (2018). Co-treatment with clonidine and a GRK2 inhibitor prevented rebound hypertension and endothelial dysfunction after withdrawal in diabetes. *Hypertens Res.* 41(4): 263-274.

Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Poeggeler B., Lopez-Burillo S., Mayo J.C., Sainz R.M., Reiter R.J. (2003). Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res.* 34(4): 249-59.

Tang E.H., Vanhoutte P.M. (2009). Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther.* 122(2): 140-9.

Tang J., Li N., Chen X., Gao Q, Zhou X., Zhang Y., Liu B., Sun M, Xu Z. (2017). Prenatal hypoxia induced dysfunction in cerebral arteries of offspring rats. *J Am Heart Assoc.* 6:e006630.

Thakor A.S., Herrera E.A., Serón-Ferré M., Guiassani D.A. (2010). Melatonin and vitamin C increase umbilical blood flow via nitric oxide- dependent mechanisms. *J Pineal Res.* 49(4): 399-406.

Thakor A.S., Allison B.J., Niu Y., Botting K.J., Serón-Ferré M., Herrera E.A., Giussani D.A. (2015). Melatonin modulates the fetal cardiovascular defense response to acute hypoxia. *J Pineal Res.* 59: 80–90.

Theise N. (2015). Hígado y vesícula biliar. *En: Robin y Cotran. Patología estructural y funcional.* 9° ED. Elsevier Saunders. pp 821-882.

Thorup C., Jones C., Gross S., Moore L., Goligorsky M. (1999). Carbon monoxide induces dilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol Renal Physiol.* 277: F882- F889.

Torres-Farfan C., Valenzuela F.J., Mondaca M., Valenzuela G.J., Krause B., Herrera E.A., Riquelme R., Llanos A.J., Serón-Ferré M. (2008). Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. *J Physiol.* 586: 4017–4027.

Torres F.S. (2014). Rol antioxidante de melatonina en el desbalance oxidativo presente en la hipertensión pulmonar del neonato de oveja crónicamente hipóxico. MSc Thesis, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

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

Turner J., Dunn L., Tarnow-Mordi W., Flatley C., Flenady V., Kumar S. (2020). Safety and efficacy of sildenafil citrate to reduce operative birth for intrapartum fetal compromise at term: a phase 2 randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol.* 222(5), 401–414.

Van Nueten J.M., Janssens W.J., Vanhoutte P.M. (1985). Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacol Res Comm.* 17(7): 585-608.

Valdez L.B., Arnaiz S.L., Bustamante J., Alvarez S., Costa L.E., Boveris A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res.* 33(2), 65–70.

Vitali, S. H., Mitsialis, S. A., Christou, H., Fernandez-Gonzalez, A., Liu, X., &

Kourembanas, S. (2005). Mechanisms of heme oxygenase-1-mediated cardiac and pulmonary vascular protection in chronic hypoxia: Roles of carbon monoxide and bilirubin. *Chest*, 128(6 SUPPL.), 578S-579S.

Vitali S.H., Mitsialis S.A., Liang O.D., Liu X., Fernandez-Gonzalez A., Christou H., Wu X., McGowan F.X., Kourembanas S. (2009). Divergent cardiopulmonary actions of heme oxygenase enzymatic products in chronic hypoxia. *PLoS One*. 4(6): e5978.

Villamor E., Moreno L., Mohammed R., Pérez-Vizcaíno F., Cogolludo A. (2019). Reactive oxygen species as mediators of oxygen signaling during fetal to neonatal circulatory transition. *Free Radic Biol Med*. 142(1), 82–96.

Weekley L.B. (1993). Effects of melatonin on isolated pulmonary artery and vein: role of the vascular endothelium. *Pulm Pharmacol*. 6: 149–154.

Williams J.M., Pearce W.J. (2006). Age-dependent modulation of endothelium-dependent vasodilatation by chronic hypoxia in ovine cranial arteries. *J Appl Physiol* (1985). 100: 225–232.

White K., Marletta M. (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome p450 type hemoprotein. *Biochemistry*. 31: 6627- 6231.

Wu L., Wang R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. 57(4):585-630.

Yang Q., Scalbert E., Delagrangé P., Vanhoutte P.M., O'Rourke S.T. (2001). Melatonin potentiates contractile responses to serotonin in isolated porcine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280: H76-H82.

Yang Y., Duan W., Jin Z., Yi W., Yan J., Zhang S., Wang N., Liang Z., Li Y., Chen W., Yi D., Yu S. (2013). JAK2/STAT 3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/ reperfusion injury. *J Pineal Res*. 55(3): 275-86.

Zawilska J.B., Skene D.J., Arendt J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep*. 61: 383–410.

Zhang H., Akbar M., Kim H. (2012). Is sildenafil an effective therapy in the management of persistent pulmonary hypertension? *J Clin Neonatal*. 1(4): 171-5.

Zhao L., Mason N.A., Morrell N.W., Kojonazarov B., Sadykov A., Maripov A., Mirrakhimov M.M., Aldashev A., Wilkins M.R. (2001). Sildenafil inhibits hypoxia induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 104: 424–428.

Zuckerbraun, B. S., Beek, Y. C., Wegiel, B., Billiar, T. R., Czimadia, E., Rao, J., Shimoda L., Ifedigbo E., Kanno S., Otterbein, L. E. (2006). Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med*. 203(9), 2109–2119.