



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**CINACIGUAT (BAY-582667), UN ACTIVADOR DE LA GUANILIL CICLASA
SOLUBLE (sGC) MODIFICA LA FUNCIÓN CARDIOPULMONAR EN CORDEROS
RECIÉN NACIDOS HIPÓXICOS E HIPERTENSOS PULMONARES EN EL ALTO
ANDINO.**

FELIPE AUGUSTO BEÑALDO FUENTES

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

Director de Tesis: Prof. Dr. Jorge Aníbal Llanos Mansilla

Co-tutor: Prof. Dr. Germán Ebensperger

2019

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

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

FELIPE AUGUSTO BEÑALDO FUENTES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiopatología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27, junio, 2019.

**Prof. Dr.(a) Aníbal Llanos Mansilla
Director(a) de Tesis
Programa de Fisiopatología
Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal
Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Desarrollo**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr.

Prof. Dr.

**Prof. Dr.
Presidente Comisión**



Índice

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Índice.....	3
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Abreviaciones.....	11
1. Introducción.....	12
2. Hipótesis.....	19
3. Objetivo general.....	19
4. Objetivos específicos.....	20
5. Material y métodos.....	21
5. a) Experimentos <i>in vivo</i>.....	22
Prueba de dosis.....	22
Administración aguda y tratamiento crónico con cinaciguat.....	23
Hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta.....	23
5. b) Eutanasia.....	24
5. c) Disección de ventrículo derecho.....	24
5. d) Disección de pulmones.....	25
Experimentos <i>ex vivo</i>: miografía de arterias pequeñas pulmonares.....	25
Histología.....	28
Inmunohistoquímica.....	29
Determinaciones <i>in vitro</i>.....	30



5. e) Estadística.....	31
5. f) Cálculo del tamaño muestral.....	32
6. Resultados.....	33
6. a) Pruebas de dosis.....	33
Vía sistémica (vía vena femoral).....	33
Vía pulmonar (Swan-Ganz).....	35
6. b) Respuesta a administración aguda de cinaciguat.....	37
6. c) Respuesta a tratamiento crónico con cinaciguat.....	38
6. d) Respuesta a hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta.....	39
6. e) Índice de hipertrofia cardíaco derecho (ICHD).....	41
6. f) Histología.....	41
6. g) Inmunohistoquímica.....	42
6. h) Reactividad vascular: respuesta a vasoconstrictores.....	43
6. i) Reactividad vascular: respuesta a vasodilatadores.....	47
6. j) Expresión proteica.....	49
7. Discusión.....	51
8. Bibliografía.....	71
9. Anexos.....	87
A. Certificación del Comité de Bioética Animal (# 0643), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.....	87
B. Expresión proteica de HO-1 en tejido pulmonar.....	88
C. Densidad celular del área de la capa muscular por micrómetro cuadrado (%) en APP.....	89
D. Área pared absoluta (μm^2) en arterias pequeñas pulmonares.....	90



Dedicatoria

A todos aquellos(as) que me han acompañado en el proceso de esta tesis, han estado a mi lado en todo momento y a quienes tanto quiero:

A mis padres, que me educaron y dieron las herramientas para entregar lo mejor de mi persona en cada tarea. Papá (José Beñaldo) gracias por ser un modelo de amor, entrega y sacrificio a la familia, mamá (Mirta Fuentes), sé que en alguna parte de tu cansada mente estás feliz de vernos crecer, como nos criaste a mi hermano y a mí. A mi hermano Clinton, mis sobrinos Amelia y Alfonso que me entregan su amor y apoyo cada vez que los veo.

A mi familia no sanguínea, mis amigos que han estado en las buenas y en las malas: Cristián Parra, Carlos Fernández, Derek Castillo, Víctor Sandoval, Francisco y Sebastián Vizcarra, Rodrigo Bustamante, Ricardo Rothen, Eduardo Castillo y Paulina Macías.

Finalmente, a mi familia, mi amor Andrea Saavedra Álvarez y Lilu, gracias por apoyarme tanto, ser paciente, amarme, cuidarme y hacerme ver que con cariño y esfuerzo, todo lo que nos propongamos podremos realizarlo.



Agradecimientos

Al financiamiento y aprendizaje adquirido en esta Tesis a través del proyecto Fondecyt 1140647 cuyo Investigador Responsable fue el Dr. Aníbal Llanos Mansilla. Sumado a los proyectos Fondecyt 1151119 del Dr. Emilio Herrera Videla, 1130424 del Dr. Germán Ebensperger, y 1120605 del Dr. Víctor Roberto Reyes, que aportaron en mi aprendizaje de diversas técnicas durante el desarrollo de esta tesis.

A mi Director de Tesis, Dr. Aníbal Llanos Mansilla, gran guía, tutor y un ejemplo a seguir como científico, el cual en términos personales se ha convertido en un entrañable amigo. Al Dr. Germán Ebensperger Darrouy, cotutor de esta Tesis, cuyos consejos generaron una apertura de mi mente, además de brindarme su amistad. Al Dr. Emilio Herrera Videla, tutor académico y colega, que ha demostrado que nuestra profesión es primordial para realizar investigación del más alto nivel. Al Dr. Víctor Reyes Catalán cuya disposición siempre ha estado presente a explicarme las más diversas inquietudes que se presentaron durante este proceso. Fuera de ello agradezco al Dr. Manuel Oyarzún ex Director y a la Dra. Patricia Díaz Amor Directora del Programa de Fisiopatología, Medicina Oriente, Universidad de Chile, quienes me brindaron toda su confianza en que podría compatibilizar mis estudios con el trabajo que desempeño en esta casa de estudios. Sumado a esto, agradezco a los docentes del Programa quienes fueron parte de este proceso formativo, en particular a la Dra. María Josefa Serón Ferré, su conocimiento, pulcritud científica, amabilidad y paciencia generaron en mí amplios conocimientos nuevos, así como la Dra. Tatiana Reyes, Dr. Raúl Domenech y Dr. Víctor Parra.

No quiero dejar de mencionar a toda la gente que hace de Salvador 486 un lugar muy especial, entre ellas: Claudio Araya por toda su ayuda técnica en esta tesis, Renato Ebensperger por su amistad y experiencia, Javiera Ferrada y Marcela Díaz por sus sonrisas y cariño cada vez que compartimos, Sebastián Castillo, Rocío Bascuñan, Millisent Aránguiz, Zhuoming Chen, Daniel Poblete y Constanza Guzmán por hacer de muchas tardes una sonrisa. Ismael Hernández, Auristela Rojas y Mireya Delgado por todos sus consejos. Juan Carlos Fuenzalida y Carlos Brito por guiarme y entregarme toda la experiencia adquirida durante estos años. A las funcionarias Sonia Carrasco, Roxana Valenzuela, Rosita Contreras y a todas las personas pertenecientes a este Programa. ¡A todos ellos(as)...Muchas Gracias!



Resumen

Durante la transición feto-neonatal, debido a los marcados cambios que tienen lugar en la circulación cardiopulmonar, los neonatos son muy proclives a presentar el síndrome de hipertensión pulmonar neonatal (HPN). Esta patología se caracteriza por un aumento de presión arterial pulmonar, producida por una vasoconstricción pulmonar sostenida, asociada con remodelamiento vascular, resultando en una alta resistencia vascular pulmonar (RVP). Una enzima central en las vías vasodilatadoras es la sGC, que cuando se oxida no responde al NO, perdiendo la capacidad de vasodilatar y prevenir el remodelamiento vascular pulmonar. Los corderos neonatos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares, nacidos en el altiplano andino, tienen una notable disminución en la expresión y función de la enzima sGC, por lo que la concentración de cGMP en el pulmón está disminuida, pudiendo ser la causa, junto con otras, de la HPN. Considerando que más del 40% de los niños recién nacidos con HPN no responden a la terapia de NO inhalatorio, por posible oxidación de la enzima, proponemos como hipótesis que cinaciguat (BAY-582667), activa la sGC oxidada en corderos recién nacidos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares, en el Alto Andino, a 3600 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

Para verificar esta hipótesis utilizamos neonatos de oveja separado en 2 grupos (n=6 en cada grupo) tratados con: a) cinaciguat b) vehículo (DMSO: NaCl 0,9 %, 1:10) Determinamos: 1) *in vivo*, variables cardiovasculares que den cuenta de la circulación pulmonar y sistémica durante 7 días, después de una infusión diaria de cinaciguat o vehículo, y durante un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta; 2) morfología de

arterias pequeñas pulmonares (APP) (histología e inmunohistoquímica) y de ventrículos derechos (índice de hipertrofia cardíaca derecha); 3) *ex vivo*, funciones vasoactivas en arterias pequeñas pulmonares; 4) *in vitro*, expresiones de algunas proteínas involucradas en la vía de señalización de óxido nítrico (NO) y sGC implicadas en la reactividad vascular pulmonar. Con el uso de cinaciguat en comparación con los controles, encontramos que la presión arterial pulmonar disminuyó en el tratamiento agudo sin mayores modificaciones de la circulación sistémica, y hubo una menor hipertensión pulmonar en la hipoxia aguda sobreimpuesta, acompañada de una disminución de la RVP en el tratamiento agudo, crónico y un menor aumento durante la hipoxia aguda sobreimpuesta. También se redujo del remodelamiento vascular de las APP y disminuyó la hipertrofia del ventrículo derecho, con un menor tono vascular pulmonar, con modificaciones en la expresión de proteínas ligadas a mecanismos de vasodilatación pulmonar. En resumen, la administración de cinaciguat, un activador de la sGC, tuvo importantes modificaciones cardiopulmonares en corderos recién nacidos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares.



Abstract

During the feto-neonatal transition, due to the marked changes that take place in the cardiopulmonary circulation, neonates are highly vulnerable to develop the syndrome of pulmonary hypertension of the newborn (PHN). This pathology is maintained over time due to sustained pulmonary vasoconstriction, associated with vascular remodeling, both in the muscular layer and adventitia, resulting in high pulmonary vascular resistance (PVR). A central enzyme in the vasodilator pathways is the sGC, which needs the heme group present in it and with reduced iron to be activated by NO. Once activated, produces cGMP, a central molecule to yield pulmonary vasodilation. When sGC is oxidized, it does not respond to NO to generate cGMP, losing the vasodilator capacity and the prevention of vascular remodeling. Chronically hypoxic and pulmonary hypertensive neonatal lambs, born in the Andean highlands, have a notable decrease in the expression and function of the sGC, decreasing the cGMP concentration in the lung and may be the cause, among others, of the neonatal pulmonary hypertension. Considering that more than 40% of newborn infants with arterial pulmonary hypertension do not respond to NO inhalation therapy, due to possible oxidation of the enzyme, we hypothesize to use cinaciguat (BAY-582667), as a drug to activate the sGC oxidized or without heme group.

To test this hypothesis, we used an integrative approach of the whole animal, isolated organs, morphological and molecular level to determine the effects of cinaciguat in chronically hypoxic and pulmonary hypertensive newborn lambs, studied at 3,600 m above sea level (m.a.s.l.). We determined: 1) *in vivo*, cardiovascular variables that

account for the pulmonary and systemic circulation during 7 days, after daily infusion of cinaciguat or vehicle, and during a superimposed episode of acute hypoxia; 2) morphology of small pulmonary arteries (SPA) (histology and immunohistochemistry) and right ventricles (right cardiac hypertrophy index); 3) *ex vivo*, vasoactive functions in small pulmonary arteries; 4) *in vitro*, protein expressions involved in the signaling pathway of nitric oxide (NO)-sGC implicated in pulmonary vascular reactivity. Using cinaciguat in comparison with controls, we found a decrease in pulmonary arterial pressure during the acute treatment accompanied by a lower pulmonary hypertension in a superimposed episode of acute hypoxia, without major modifications of the systemic circulation. Further, the PVR diminished in the acute, chronic treatment, and had a minor increase during the superimposed episode of acute hypoxia. The vascular remodeling of SPA was also reduced and right ventricle hypertrophy was decreased, accompanied by a lower pulmonary vascular tone, with modifications in the expression of proteins linked to pulmonary vasodilation mechanisms. In summary, the administration of cinaciguat, an activator of sGC, had important cardiopulmonary modifications in chronically hypoxic and pulmonary hypertensive newborn lambs.



Abreviaciones

Ácido desoxirribonucleico (**DNA**); ácido ribonucleico mensajero (**mRNA**); activador canales BKCa (**NS1619**); análogo de tromboxano (**U46619**); anión superóxido (**O₂⁻**); arterias pequeñas pulmonares (**APP**); cadena liviana de miosina (**MyLC**); cadena pesada de miosina tipo alfa (**MyHC α**); canales de potasio (**Kv**); canales de potasio de alta conductividad dependiente de calcio (**BKCa**); canales de sodio sensibles a amilorida (**ENaC**); cinaciguat (**BAY-582667**); cloruro de potasio (**KCl**); concentración de agonista que genera el 50% de la respuesta máxima (**EC₅₀**); curva concentración respuesta (**CCR**); dihidrobiopterina (**BH₂**); elemento de respuesta a la hipoxia (**HRE**); endotelina (**ET-1**); especies reactivas de oxígeno (**ROS**); factor inducible por hipoxia (**HIF**); flavin adenin dinucleótido (**FAD**); *Food and Drug Administration* (**FDA**); fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (**MLCP**); fosfodiesterasa 5 (**PDE5**); frecuencia cardíaca (**FC**); gasto cardíaco (**GC**); grupos tioles (**H₂S**); guanilil ciclase soluble (**sGC**); guanosín monofosfato cíclico (**cGMP**); guanosín trifosfato (**GTP**); hipertensión pulmonar del recién nacido (**HPN**); índice hipertrofia cardíaca derecha (**IHCD**); intercambiador sodio-hidrógeno (**NHE1**); logaritmo negativo de la concentración del agonista que genera el 50% de la respuesta máxima (**pD₂**); monóxido de carbono (**CO**); Newton dividido por metro (**Nm⁻¹**); nicotinamida dinucleótido reducido (**NADH**); nitroprusiato de sodio (**SNP**); nuclear factor of activated T-cells (**NFAT**); *nucleus tractus solitarius* (**NTS**); óxido nítrico (**NO**); óxido nítrico inhalatorio (**iNO**); óxido nítrico sintasa endotelial (**eNOS**); presión arterial pulmonar media (**mPAP**); presión arterial sistémica (**mPAS**), presión parcial de oxígeno (**PO₂**); prostaciclina (**PGI₂**); proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺-calmodulina (**CaM-kinase II**); proteína quinasa dependiente de cGMP (**PKG-1**); recién nacidos (**RN**); resistencia vascular pulmonar (**RVP**); resistencia vascular sistémica (**RVS**); serotonina (**5HT**); transient receptor potential cation channels (**TRPC**); tetrahidrobiopterina (**BH₄**); unidades relativas (**UR**); ventrículo derecho (**VD**); ventrículo izquierdo (**VI**).



1. Introducción

La circulación pulmonar fetal se caracteriza por una alta resistencia vascular y un bajo flujo sanguíneo, con sólo el 5% del gasto cardíaco combinado pasando por los pulmones fetales (Rudolph, 1979; Gao & Raj, 2010). Así, la presión arterial pulmonar (PAP) es ligeramente más alta que la sistémica y el 90% del gasto cardíaco derecho fluye a través del *ductus arteriosus* de derecha a izquierda, hacia la aorta descendente, y luego a la placenta (Rudolph, 1979). Al momento de nacer, la circulación pulmonar experimenta una importante disminución de la resistencia vascular pulmonar (RVP) y de la PAP. Algunos de los mecanismos responsables de estos cambios son: la presencia de oxígeno en los alvéolos pulmonares y en los vasos pulmonares, consecuencia del inicio de la función pulmonar, con un brusco incremento de la presión parcial de oxígeno (PO_2), que dilata los vasos pulmonares; además se instala una interfase aire-líquido gracias al surfactante que evita el colapso alveolar al fin de la espiración; cierre de los *shunts* fetales (*foramen ovale*, *ductus arteriosus* y *venosus*), que junto con la marcada caída de la RVP, permiten que el 100% del gasto cardíaco perfunda la circulación pulmonar, lo que conlleva un substancial aumento del estrés tangencial (*shear stress*); se incrementa la expresión y función de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), por el estrés tangencial, que genera óxido nítrico (NO), además hay un alza en la producción de prostaciclina (PGI_2), provocando y manteniendo la vasodilatación pulmonar (Abman *et al.*, 2015; Rudolph, 1979); Finalmente, existe una masiva y rápida reabsorción del líquido pulmonar por la mayor expresión y función de canales de sodio sensibles a amilorida (ENaC) (Gugliani *et al.*, 2008; Olver *et al.*, 1986).

La hipoxia crónica intrauterina y perinatal altera la transición fisiológica pulmonar normal anteriormente descrita. Ésta llevará a un desbalance de los mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores en la circulación pulmonar hacia un estado vasoconstrictor (Abman, 1999). Esta vasoconstricción mantenida en el tiempo lleva a remodelamiento vascular pulmonar, debido a un aumento del número de células vasculares musculares lisas y/o hipertrofia de las mismas, además de otras células que emigran de la capa intersticial (Stenmark *et al.*, 2006). Estos cambios morfológicos, disminuyen el lumen de las arterias en forma sostenida, siendo este último cambio el mayor componente del aumento de la resistencia vascular. Este incremento se puede explicar por la ley de Poiseuille, donde la resistencia vascular es inversamente proporcional a la cuarta potencia del radio del vaso (Kuhr *et al.*, 2012). Por lo tanto, aumentará la RVP y se instalará una hipertensión pulmonar crónica (Herrera *et al.*, 2008b). Más aún, también se ha visto remodelamiento de la adventicia, que lleva a un incremento en la rigidez del vaso sanguíneo (Stenmark *et al.*, 2018).

La hipertensión arterial pulmonar se define como valores de presión arterial media (mPAP), en reposo, igual o superior a 25 mmHg (Ivy, 2016; Escribano *et al.*, 2010). La hipertensión pulmonar crónica, aumenta la postcarga cardíaca derecha y puede producir consecuencias graves en el corazón, generando una hipertrofia cardíaca derecha (Whaithy *et al.*, 2004), y eventualmente puede llegar a una insuficiencia cardíaca derecha, con resultado de muerte (Ivy, 2016). Además, aumentos agudos de la mPAP y de la vasoconstricción vascular pulmonar durante el transcurso de la enfermedad, llevan a alteraciones de la relación ventilación/perfusión (V/Q), por lo que los neonatos pueden cursar con hipoxias con valores de PaO₂ de 30 mmHg

(comunicación personal Dr. Aníbal Llanos, 2016). Por otra parte, la hipertensión pulmonar neonatal puede presentarse en forma primaria o secundaria a una hipoxia crónica *in utero*, asfixia durante el parto, aspiración de meconio, infecciones pulmonares, especialmente por estreptococo β hemolítico grupo B, hipoplasia pulmonar, hernia diafragmática congénita, drogas, entre otras causas (Lakshminrusimha & Keszler, 2015). Su prevalencia es aproximadamente 2 por cada 1000 recién nacidos (RN) vivos (MINSAL, 2011) o de 0,4 a 6,8 por 1000 RN vivos (Walsh-Sukys *et al.*, 2000), ambas prevalencias en RN de tierras bajas (< 2500 m.s.n.m.). En contraste, en tierras altas (> 2500 m.s.n.m.) no hay información específica de la prevalencia. No obstante, en La Paz, Bolivia (sobre los 3600 m.s.n.m.), por la menor presión parcial de oxígeno existente, el síndrome de distrés respiratorio del neonato puede alcanzar una prevalencia de hasta un 9,1% (7,7% - 10,5%) de los nacidos vivos, y éste cuadro incluye la hipertensión pulmonar neonatal (Keyes *et al.*, 2003).

La Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal, Programa de Fisiopatología, Facultad de Medicina Oriente, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Universidad de Chile, ha desarrollado un modelo en corderos RN en las grandes altitudes de Putre (3600 m.s.n.m.), con el fin de estudiar la hipoxia perinatal y específicamente la hipertensión pulmonar neonatal inducida por hipoxia crónica gestacional (Herrera *et al.*, 2007, 2008a, 2008b; Parrau *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2015; Lopez *et al.*, 2016). Es sabido que en tierras altas (> 2500 m.s.n.m.), existe una baja presión parcial de oxígeno ambiental y la gestación en este ambiente genera fetos crónicamente hipóxicos (Herrera EA. *et al.*, 2016) y al nacer, estos neonatos son crónicamente

hipóxicos e hipertensos pulmonares (Herrera *et al.*, 2007). En ellos, se han explorado algunos de los mecanismos que llevan a la hipertensión pulmonar y con ese conocimiento se han estudiado nuevas alternativas al tratamiento de este síndrome de la etapa neonatal. Es menester decir, que el único tratamiento aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA, USA), para la hipertensión pulmonar del recién nacido es el óxido nítrico inhalatorio (iNO), el cual no es efectivo en el 40 % de los casos (Steinhorn *et al.*, 2010). Esta cifra es semejante en neonatos pretérminos (30 %) (Rallis *et al.*, 2018), e incluso el uso de iNO, en fallas hipóxicas respiratorias de neonatos pretérminos, no parece ser una terapia de rescate efectiva en los casos más graves (Barrington *et al.*, 2017). La razón de la ineficiencia del iNO, es que al ser administrado en grandes dosis aumentará el desacoplamiento de la eNOS debido a la oxidación de la tetrahydrobiopterina (BH₄), que se transforma en dihydrobiopterina (BH₂). En esta condición, la eNOS pierde su forma estable, deja de producir NO y genera radical anión superóxido (O₂⁻), aumentando la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Tabima *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2015). El aumento de las ROS que se observa en los neonatos crónicamente hipóxicos llevaría a una mayor oxidación de la sGC, que produciría la pérdida del grupo hemo (Stasch *et al.*, 2002, 2011), produciendo menos cGMP disminuyendo la vasodilatación vascular pulmonar, vía que a continuación detallaremos.

La vía de señalización involucrada en la vasodilatación comienza en el endotelio pulmonar, donde se ubica la eNOS, la cual contiene un grupo hemo y que además necesita para funcionar los siguientes cofactores: nicotinamida dinucleótido reducido (NADH), flavin adenin dinucleótido (FAD), calmodulina y BH₄ (Duarte *et al.*, 2008). La

eNOS en su forma estable (dímero) utiliza como sustratos L-arginina, oxígeno molecular y NADPH para producir L-citrulina y NO (Tabima *et al.*, 2012; Pernow & Jung, 2013). El NO difunde hacia la célula muscular lisa y actúa sobre el receptor de NO, la guanilil ciclasa soluble (sGC), la cual utiliza guanosín trifosfato (GTP) y forma guanosín monofosfato cíclico (cGMP) (Gao & Raj, 2010). El cGMP generado por la sGC entre otras acciones, estimula a la proteína quinasa G dependiente de cGMP (PKG-1), PKG-1 que, a su vez fosforila en dos serinas a la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLCP), en su unidad regulatoria MYPT1, activándola (Woolridge *et al.*, 2004). Por otra parte, ROCK II fosforila en dos treoninas a MYPT1, inactivándola (Lopez *et al.*, 2016). Si predomina la acción de PKG-1 sobre ROCK II, llevará a la defosforilación de la cadena liviana de la miosina, provocando así la vasodilatación vascular pulmonar. Además, PKG-1, fosforila otros blancos, como el canal de potasio de alta conductividad dependiente de calcio (BK_{Ca}), hiperpolarizando la célula muscular lisa, disminuyendo la concentración de Ca^{2+} intracelular por bloqueo de los canales de Ca dependientes de voltaje, lo que llevará a una vasorelajación (Gao & Raj, 2010).

Esta vía molecular fue estudiada en corderos RN hipóxicos crónicos e hipertensos pulmonares (tierras altas), Herrera *et al.*, 2008a, quien demostró que la expresión proteica de eNOS y su función productora de NO (esta última medida como producción de L-citrulina), están aumentadas al compararse al grupo control de tierras bajas. Por el contrario, en este mismo modelo, se describe que la expresión proteica de sGC se encuentra marcadamente disminuida en los corderos de tierras altas. Por otra parte, la concentración de cGMP pulmonar se encuentra disminuida en animales de tierras

altas al compararse con mediciones de tierras bajas (Ferrada *et al.*, 2015). Además, la sGC puede encontrarse oxidada por los ROS generados por la hipoxia crónica (Chester *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015), condición en que la sGC no responde a NO (Bellamy *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005), lo que llevaría a una menor vasodilatación pulmonar. Por lo que una alternativa a mejorar los mecanismos vasodilatadores es que la sGC puede ser activada o estimulada por diversas moléculas para generar cGMP. Es así como los estimuladores ejercen su modo de acción en presencia de un grupo hemo en estado reducido (ferroso) de la sGC, mientras que los activadores son efectivos en presencia de un grupo hemo oxidado (férico) e incluso con la sGC sin grupo hemo (Stasch *et al.*, 2011).

De esta manera, un eventual tratamiento para la hipertensión pulmonar sería utilizar un activador de la sGC, el que actuaría en el grupo hemo en estado oxidado o en una enzima sin grupo hemo. Cinaciguat (BAY-582667), se ha descrito como un activador de la sGC, a pesar de haber sido oxidada por el inhibidor ODQ o encontrarse la enzima sin el grupo hemo, a diferencia de NO y de otros estimuladores como YC-1, BAY 41-2272, o BAY 63-2521, también llamado riociguat (Stasch *et al.*, 2002, 2011). En un modelo de hipertensión pulmonar neonatal por ligadura del *ductus arteriosus* fetal y luego ventilado mecánicamente al momento de nacer, cinaciguat provocó una vasodilatación pulmonar en forma aguda (Chester *et al.*, 2011). Cinaciguat también aumentó el flujo sanguíneo pulmonar y disminuyó la RVP en forma aguda, en fetos de oveja con hipertensión pulmonar por ligadura del *ductus arteriosus* (Chester *et al.*, 2009).

Considerando estos antecedentes, el propósito de este proyecto de Tesis fue evaluar los efectos de un tratamiento con administración endovenosa de cinaciguat por 7 días y durante un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta, en corderos RN crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares de Putre, Región de Arica y Parinacota (3600 m.s.n.m.), usando una aproximación integrativa: *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Estudiamos variables cardiovasculares pulmonares y sistémicas, propiedades vasoactivas en arterias pequeñas pulmonares (APP), histología e inmunohistoquímica en APP. Caracterizamos la expresión proteica y la función por miografías en APP, de las principales proteínas o enzimas que participan en la vía de eNOS-NO-sGC-PKG-1-BK_{Ca}, y el rol que juega esta vía en la vasodilatación mediada por cinaciguat, con el fin de obtener información de algunos mecanismos de acción de un activador de sGC (cinaciguat) en el recién nacido crónicamente hipóxico y eventualmente como posible tratamiento para la hipertensión arterial pulmonar del recién nacido.

Todos los experimentos fueron financiados por el Proyecto Fondecyt 1140647, dirigido por el Dr. Aníbal Llanos Mansilla.



2. Hipótesis

La administración de cinaciguat (BAY-582667) en corderos neonatos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares, provoca una disminución de la resistencia vascular y de la hipertensión pulmonar, como consecuencia de un menor tono vascular y menor remodelamiento vascular pulmonar, disminuyendo la hipertrofia cardíaca derecha, además afecta la expresión de proteínas relacionadas a mecanismos de vasodilatación pulmonar.

3. Objetivo general

Determinar si la administración de cinaciguat disminuye el remodelamiento vascular pulmonar y la hipertrofia cardíaca derecha, modificando las propiedades vasoactivas de la circulación pulmonar y la expresión de proteínas involucradas en mecanismos de vasodilatación del neonato ovino hipertenso pulmonar crónicamente hipóxico.



4. Objetivos específicos

1. Determinar la dosis efectiva de cinaciguat, necesaria para disminuir la resistencia vascular y presión de la arteria pulmonar, sin producir hipotensión sistémica.
2. Determinar el efecto de cinaciguat sobre las variables cardiovasculares pulmonares y sistémicas: a) durante la administración aguda; b) mediciones del efecto crónico sobre las variables cardiovasculares, antes de inyectar el cinaciguat, cada día, y durante los siete días de tratamiento; c) como se modifican las respuestas *in vivo* en un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta. (presión arterial pulmonar media (mPAP), resistencia vascular pulmonar (RVP), presión arterial sistémica media (mPAS), resistencia vascular sistémica (RVS), gasto cardíaco (GC) y frecuencia cardíaca (FC)).
3. Determinar el efecto del tratamiento de cinaciguat sobre el remodelamiento y patrones de proliferación de arterias pequeñas pulmonares.
4. Determinar el efecto del tratamiento de cinaciguat sobre la hipertrofia del ventrículo derecho.
5. Determinar el efecto del tratamiento de cinaciguat sobre la funcionalidad de agentes vasoconstrictores y vías vasodilatadoras dependientes de sGC en arterias pequeñas pulmonares.
6. Determinar si el tratamiento de cinaciguat tiene algún efecto sobre la expresión de proteínas que participan en la vía de señalización dependiente de sGC en los corderos gestados en hipoxia crónica.



5. Materiales y métodos

Este estudio está inserto en el proyecto Fondecyt 1140647, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA N° 0643 FAMUCH) (Anexo A). Se utilizaron catorce corderos recién nacidos gestados y nacidos en la Estación Experimental Putre, INCAS (Internacional Center for Andean Studies) de la Universidad de Chile, a 3600 m.s.n.m., Región de Arica y Parinacota, Chile. Estos corderos estuvieron expuestos a hipoxia crónica de grandes altitudes durante la concepción, toda su gestación y vida postnatal. Se utilizaron dos animales (macho y hembra) para pruebas de dosis del fármaco, con el fin de verificar las respuestas *in vivo* para determinar la dosis necesaria que genere una disminución significativa en la mPAP y RVP, evitando una hipotensión sistémica. Los restantes doce animales fueron separados en dos grupos: seis tratados con cinaciguat (3 hembras / 3 machos) y seis controles tratados con el vehículo (dimetil sulfóxido (DMSO): NaCl 0,9 %, 1:10; 4 hembras / 2 machos).

Todos los animales fueron instrumentalizados bajo protocolos determinados por el programa de Fisiología y Fisiopatología Perinatal (Herrera *et al.*, 2007; 2008a; 2008b; 2010a; Ebensperger, 2011; Parrau *et al.*, 2013, Torres *et al.*, 2015; Castillo-Galán *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016) que consistieron en usar anestesia general al día 3 de nacidos, inyectando ketamina ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ im.}$), xilazina ($0,1 - 0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ im.}$) y atropina ($0,04 \text{ mg kg}^{-1} \text{ im.}$). Adicionalmente en las zonas de incisión se infiltró localmente lidocaína al 2% con el fin de evitar el malestar animal. Se ubicó un catéter Swan-Ganz (Edwards Swan-Ganz 5 French, Baxter Healthcare Corporation), el cual quedó

instalado en la arteria pulmonar. Además, se insertaron catéteres de polivinilo (1,2 mm de diámetro interno) en la aorta descendente y la vena cava inferior, con el fin de tener acceso endovenoso al territorio sistémico, desde donde se tomaron muestras sanguíneas para mediciones de gasometría y determinar variables sistémicas. Todos los catéteres fueron exteriorizados y ubicados en bolsillos de género junto a la piel. Se inyectó oxitetraciclina $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ sc.}$, durante la cirugía y tres días después de realizada, para evitar infecciones (Craigmill *et al.*, 2000). Por último, fue inyectado metamizol sódico ($0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ sc.}$) durante los tres primeros días postoperatorios, para evitar el dolor asociado a la cirugía.

5. a) Experimentos *in vivo*

Prueba de dosis

En primera instancia se utilizaron dos corderos para pruebas de dosis de cinaciguat, probando en territorio sistémico. Basados en Chester *et al.*, 2011, que utilizó dosis de cinaciguat de 5 hasta $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en recién nacidos de ovejas, se comenzó con $10 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ev. sistémico}$ por 10 minutos, luego se utilizó una dosis de $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ev. sistémico}$ por 10 minutos, posteriormente se aumentó a $100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ev. sistémico}$ por 10 minutos. Considerando los resultados vistos en las dosis sistémicas, se decidió utilizar el catéter Swan-Ganz como vía de infusión, ya que entrega el fármaco directamente en el territorio pulmonar. Se administró la mitad de la dosis que había causado una disminución en la mPAP ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), inyectando $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ por 10 minutos, finalmente se decidió entonces aumentar a $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ y disminuir a 3 minutos la infusión para

lograr los efectos deseados en un menor tiempo, es decir, buscando la menor dosis y tiempo de infusión necesarios para que el medicamento cause una disminución aguda de mPAP, evitando una hipotensión sistémica sostenida.

Administración aguda y tratamiento crónico con cinaciguat

Una vez determinada la dosis a utilizar durante el tratamiento se procedió a los experimentos *in vivo* (cinaciguat o vehículo), los cuales comenzaron un día después de la cirugía (día 4), siguiendo por 7 días. Durante el tratamiento se midieron durante todas las mañanas: presión arterial pulmonar media (mPAP), presión arterial sistémica media (mPAS) y frecuencia cardíaca (FC) con un sistema de adquisición de datos (Powerlab/8SP System and Chart v4.1.2 Software; ADInstruments, New South Wales, Australia) conectado a una computadora. Adicionalmente, se determinó el gasto cardíaco (GC) mediante el método de termodilución a través de una inyección de 3 ml de NaCl 0,9% a 4°C, en la arteria pulmonar vía catéter Swan-Ganz, el que estuvo conectado a un computador que realizó esta medición (COM-2 model; Baxter, Irvine, CA). Tanto RVP como resistencia vascular sistémica (RVS) fueron calculadas de acuerdo a Herrera *et al.*, 2007.

Hipoxia aguda isocápnica sobreimpuesta

Después de 7 días de tratamiento, los corderos fueron sometidos a un episodio de hipoxia aguda isocápnica sobreimpuesta (día 11), que consistió en un protocolo de 90 minutos, dividido en 3 períodos: 30 minutos basales en que el cordero RN respiró aire

ambiental, 30 minutos de hipoxia (PaO_2 : 30 ± 2 mmHg en arteria aorta) manteniendo los valores de PaCO_2 basales (isocápnic), y 30 minutos de recuperación en que el cordero RN respiró aire ambiental. La hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta se indujo con una bolsa transparente de polietileno, ubicada sobre la cabeza del animal, donde una mezcla de aire, nitrógeno (N_2) y dióxido de carbono (CO_2) fue entregada a una razón de 20 litros por minuto. Muestras sanguíneas fueron tomadas de aorta durante el experimento para determinar pH arterial (pHa), presión parcial de oxígeno arterial (PaO_2), presión parcial de dióxido de carbono (PaCO_2), concentración de hemoglobina ([Hb]) y porcentaje de saturación de la hemoglobina por oxígeno (Sat Hb %) a través de una máquina de gases (IL-Synthesis 25, Instrumentation Laboratories, Lexington, MA). La mPAP, mPAS, GC y FC fueron determinadas *in vivo* durante el protocolo. Luego se calcularon la RVP y la RVS (Herrera *et al.*, 2007).

5. b) Eutanasia

Después de 48 horas de terminado el tratamiento (7 días) y 24 horas luego del episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta (día 11 de vida), los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de tiopental sódico (100 mg kg^{-1} , ev. lento).

5. c) Disección de ventrículo derecho

Los corazones fueron removidos, disecados y separados en sus cuatro cámaras (aurículas derecha e izquierda, ventrículos derecho e izquierdo) y septum, luego fueron

pesados, determinando el índice de hipertrofia cardíaca derecha (IHCD) según la siguiente fórmula:

$$\text{IHCD} = [\text{peso ventrículo derecho gr} / (\text{peso ventrículo izquierdo gr} + \text{peso septum gr})]$$

5. d) Disección de pulmones

Los pulmones fueron removidos, pesados, disecados y sumergidos en una solución salina helada, para luego realizar: experimentos *ex vivo*, miografías de arterias pequeñas pulmonares, estudios morfológicos de histología, estudios inmunohistoquímicos y biología molecular, según los protocolos establecidos por la Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal (Herrera *et al.*, 2007; 2008a; 2008b; 2010a; Ebensperger, 2011; Parrau *et al.*, 2013, Torres *et al.*, 2015; Castillo-Galán *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016). Las muestras para biología molecular fueron traídas a Santiago a - 80° C en nitrógeno líquido para mantener la cadena de frío.

Experimentos *ex vivo*: miografía de arterias pequeñas pulmonares

Luego de la eutanasia, se disecó el árbol arterial del pulmón derecho (tercio medio) de donde se extrajeron arterias pequeñas pulmonares entre aproximadamente 150-400 μm de diámetro interno bajo una lupa (Nikon 102, 4x). Las arterias fueron cortadas en segmentos de ~2 mm de longitud. Los anillos arteriales fueron montados en un transductor de fuerza isométrico en un miógrafo (WireMyograph 610M, Danish Myo Technologies, Aarhus, Denmark), usando dos alambres de tungsteno (diámetro 40

μm). Durante el montaje de los vasos y el experimento propiamente tal, las arterias se mantuvieron en un baño a 37°C (volumen de 5 ml) con solución de Krebs cuya composición en mM fue: NaCl 118,5; NaHCO_3 25,2; KCl 4,74; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; CaCl_2 2,5; glucosa 5,0; la solución se mantuvo en un pH 7,4 burbujeando con una mezcla gaseosa de 95% O_2 y 5% CO_2 . Cada anillo arterial fue estirado hasta que alcanzó una tensión equivalente a aquella ejercida por la presión transmural, que en la altitud es de una presión media alrededor de 25 mmHg, por lo que no sobrepasó una tensión equivalente a 2,5 mN (Ferrada *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2010b; Porter *et al.*, 2000). Este diámetro óptimo es el mismo donde se observó su mayor respuesta contráctil a 125 mM K^+ , usando un protocolo de diámetro-tensión (Torres *et al.*, 2015), por lo que al obtenerlo se simulan condiciones *in vivo* ya que la respuesta vascular estimulada depende del grado de estiramiento, y éste último de la máxima respuesta vascular (Mulvany & Halpern, 1977).

Luego, para determinar la reactividad vascular contráctil máxima, se generaron curvas de concentración-respuesta a potasio (K^+) después de un período de equilibrio de 20 minutos sometiendo a los vasos a dosis crecientes de una solución de Krebs- K^+ (6,25 mM a 100 mM), lavando con solución Krebs- Na^+ dos veces entre dosis. Se realizaron incubaciones con soluciones de concentración creciente de KCl (0 mM a 125 mM), combinando fracciones de solución de Krebs- Na^+ y Krebs- K^+ para determinar la capacidad contráctil de las arterias y caracterizar la contractilidad en función de la respuesta a concentraciones crecientes de potasio (Herrera *et al.*, 2010b).

Además, se llevaron a cabo curvas de concentración respuesta (CCRs) frente a agentes vasoconstrictores, de manera de evaluar la maquinaria contráctil de la capa muscular lisa de las arterias pulmonares. Para este fin se utilizaron: endotelina-1 (ET-1, Tocris N° cat: 1160, agente vasoconstrictor endógeno, 10^{-13} M - 10^{-7} M), 5-hidroxitriptamina (5HT, Sigma N° cat: H9523, Serotonina, 10^{-10} M - 10^{-4} M) y 9,11-dideoxi-9 α , 11 α -metano epoxi PGF2 α (U46619, Cayman Chemicals N° cat: 16450, análogo de tromboxano A2, 10^{-13} M - 10^{-5} M), en condiciones iniciales de tensión basal del anillo arterial.

Para estudiar la función vasorelajante de la musculatura lisa independiente del efecto de endotelio, se realizó una preconstricción con 5HT 10^{-6} M y luego se realizó una CCR de nitroprusiato de sodio (SNP, Sigma N° cat: S0501, dador de NO, 10^{-10} M - 10^{-3} M). Para estudiar la vasodilatación mediada por activación de los canales de potasio de alta conductividad dependientes de calcio (BK_{Ca}) se realizó una preconstricción con 5HT 10^{-6} M y luego se realizó una CCR con NS1619 (Tocris N° cat: 3804, 10^{-10} M - 10^{-5} M). Para estudiar la vasodilatación mediada por aumento de cGMP producido por ciclasas solubles se realizó una preconstricción con 5HT 10^{-6} M y luego se realizó una CCR de sildenafil (Tocris, N° cat: 3784, inhibidor de la PDE5, que cataboliza el cGMP, 10^{-10} M - 10^{-5} M).

Las CCRs se analizaron en términos de sensibilidad (pD₂, donde pD₂ = - log [EC₅₀]) y corresponde a una expresión de la actividad de un fármaco, en términos de la concentración o cantidad necesaria para producir un efecto definido (Neubig *et al.*, 2003). Las respuestas contráctiles fueron expresadas como tensión (N/m) en el caso

de CCR de KCl y porcentaje de contracción (% Kmax) para CCRs de ET-1, 5HT y U46619. Las respuestas a sustancias vasorelajantes fueron expresadas como porcentaje de la reducción a una contracción sub-máxima a K⁺ (máxima relajación %). Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Boltzman en el caso de la CCR de KCl (valores absolutos, mM) o la ecuación sigmoídea para las restantes CCRs estudiadas con eje logaritmico (dosis expresadas en función de log [M]) (Prisma5, GraphPad, USA).

Histología

El pulmón izquierdo fue perfundido a través de la arteria pulmonar con suero frío (1 litro) colocado en un vástago a 34 centímetros de altura, equivalente a una presión aproximada de 25 mmHg, valor de presión arterial definido para la hipertensión pulmonar. Luego se cortó el tercio medio el pulmón, de donde se sacó un trozo de pulmón de aproximadamente 1 cm³. Este corte se dejó en una solución de paraformaldehído al 4% por 24 horas a 4°. Posteriormente, el tejido fijado fue embebido en tacos de parafina y se realizaron corte de 5 µm de espesor. Las láminas histológicas se tiñeron con las tinciones hematoxilina-eosina y van Gieson, para determinar las capas muscular y adventicia de APP. Se adquirieron imágenes de arterias pequeñas pulmonares entre 100 - 150 µm de diámetro interno, bajo criterios ya utilizados en el laboratorio (Castillo-Galán *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2015; Astorga *et al.*, 2018), utilizando una estación de trabajo (Olympus trinocular microscope-BX51 plus digital camera QimaginGO3) vinculado a un software de imágenes (ImagePro software 6.3). Al menos, se eligieron 8-10 arterias de cada uno de los diámetros y se

midieron por lo menos 4 veces los contornos internos y externos de la túnica media, y límite externo de la adventicia de cada arteria. Las áreas vasculares se calcularon usando el mismo software. El porcentaje de área vascular muscular y adventicia fueron determinados según métodos usados en el laboratorio (Torres *et al.*, 2015), los cuales se describen a continuación:

Área muscular (%) = [(área muscular externa - área interna) / área muscular externa] x 100, donde el área muscular externa y el área interna son los límites externos e internos de la túnica media, respectivamente

Área adventicia (%) = [(área adventicia externa - área muscular externa) / (área adventicia externa)] x 100, donde el área adventicia externa y área muscular externa son el límite externo de la adventicia y el límite externo de la túnica media, respectivamente.

Inmunohistoquímica

La detección inmunohistoquímica de Ki67 se realizó con anticuerpo comercial anti-Ki67 monoclonal (Millipore, Merk, MAB3242). Las secciones de tejido de 5 µm fueron expuestas brevemente a un buffer de recuperación de antígeno 1X (Target Retrieval Solution Dako) a 120° C durante 25 min. El anticuerpo primario anti-Ki67 fue incubado en albúmina de suero bovino al 1% (1:100) durante 3 horas y luego se incubaron con un polímero anti-ratón (EnVision System-HRP, Dako) durante 1 hora más. Finalmente, la reacción inmunológica se reveló con diaminobencidina, mostrando en color café los

núcleos en división celular (ki67 positivos), mientras que los núcleos que no se encontraron en división celular mostraron un color azul debido a la tinción nuclear que se realizó con hematoxilina de Harris (Astorga *et al.*, 2018). En cada uno de los animales se adquirieron 3-4 imágenes de arterias pequeñas pulmonares entre 100 - 150 de diámetro interno, utilizando una estación de trabajo (Olympus trinocular microscope-BX51 plus digital camera QimaginGO3) vinculado a un software de imágenes (ImagePro software 6.3), donde se consideraron las células ki67 positivas vs. los núcleos totales (Castillo-Galán *et al.*, 2016).

Determinaciones *in vitro*

Las preparaciones proteicas fueron desarrolladas según técnicas usadas anteriormente en el laboratorio (Castillo-Galán *et al.*, 2016). Los blots fueron previamente incubados con anticuerpos primarios: anti eNOS (BD transduction Laboratories, 610296), anti subunidad policlonal α y β de sGC (Alexis Biochemical, ALX-210-786), anti cGB-PDE (BD transduction Laboratories, 611498); anti PKG (Enzo Life Sciences, ADI KAP PK005), anti Slo1/BK_{Ca} (Neuromab, I6/60); seguido por una incubación con anti conejo IgG conjugado con peroxidasa o anticuerpo secundario anti ratón IgG (ambos provenientes de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA; usando una dilución 1:5000). Las señales fueron detectadas por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher scientific, Rockford, IL, USA) y autoradiografía. Las bandas obtenidas por inmunoblot fueron cuantificadas por análisis de densitometría usando un software de imágenes (Scion Image Beta 4.02 Win; Scion Corporation, MD, USA).

Proteína	Cantidad proteína [µg]	Dilución anticuerpo	Fabricante	N° catálogo
eNOS	8	1:1000	BD transduction Laboratories	610296
Subunidad α de sGC	8	1:5000	Santa Cruz Biotechnology	sc-376502
Subunidad β de sGC	8	1:5000	Santa Cruz Biotechnology	sc-514183
PDE5	7	1:1000	BD transduction Laboratories	611498
BK _{Ca}	20	1:1000	Neuromab	16/60
β – actina	0,5	1:5000	Thermo Fisher scientific	AC-15

Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios y condiciones de dilución para inmunoblot.

5. e) Estadística

In vivo: Los resultados fueron expresados como promedios ± ESM. Las comparaciones en cada grupo fueron realizadas utilizando un ANOVA de una vía para mediciones repetidas, con el *post-hoc* test de Dunnett, y en el caso de comparar el grupo tratado y el grupo control a través de un ANOVA de dos vías para mediciones repetidas, con el *post-hoc* test de Newman-Keuls (Prisma5, GraphPad, USA). Se consideró significativo un valor de p igual o menor que 0,05 (Glantz & Slinker, 2001).

Ex vivo: Los resultados fueron expresados como promedios \pm ESM. Las comparaciones entre el grupo tratado y control, tanto en sensibilidad (pD₂) como en % K_{max} o máxima relajación (%), fueron a través de un test no paramétrico de Mann-Whitney (Prisma5, GraphPad, USA). Se consideró significativo un valor de p igual o menor que 0,05 (Glantz, 1981).

Histología, inmunohistoquímica e *in vitro*: Los resultados fueron expresados como promedios \pm ESM. Las comparaciones entre el grupo tratado y control fueron a través de un test no paramétrico de Mann-Whitney (Prisma5, GraphPad, USA). Se consideró significativo un valor de p igual o menor que 0,05 (Glantz, 1981).

5. f) Cálculo del tamaño muestral

Para poder comparar los grupos de neonatos, con un poder de 0,8, una diferencia mínima de medias de 42%, una desviación estándar de un 18% y un valor de $\alpha = 0,05$, se necesitan 6 animales por grupo (Glantz, 1981).



6. Resultados

6. a) Pruebas de dosis

Se utilizaron dos corderos para las pruebas de dosis de cinaciguat, tanto por vía endovenosa sistémica como pulmonar.

Vía sistémica (vía vena femoral)

Se comenzó con $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ev. sistémico por 10 minutos, dosis que no mostró efectos en las variables cardiovasculares (Figura 1).

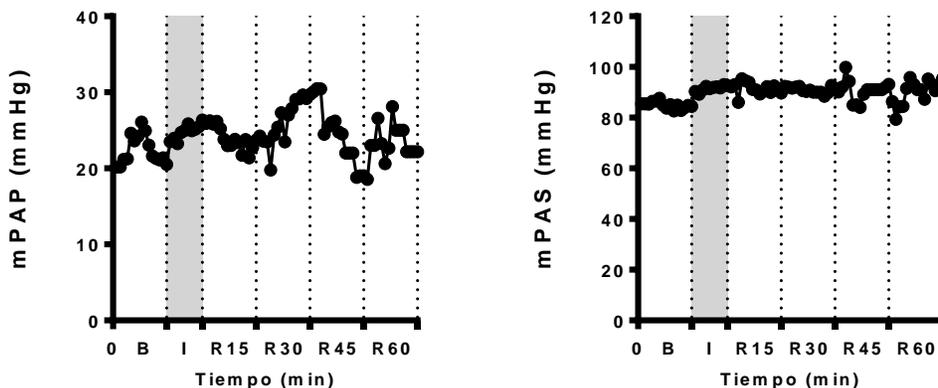


Figura 1. Evolución de la presión arterial pulmonar (mPAP) y presión arterial sistémica (mPAS) durante prueba de dosis cinaciguat ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$, 10 minutos infusión, ev. sistémico). Una prueba de dosis en un animal.

Luego se utilizó una dosis de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ev. sistémico por 10 minutos, evidenciando disminución en mPAP (47 % menor al valor basal) y caída de la presión sistémica (mPAS, 13 % menor al valor basal) (Figura 2).

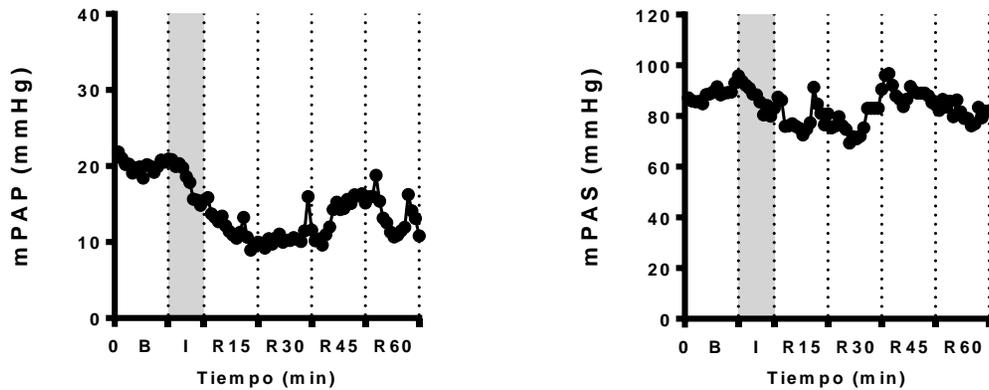


Figura 2. Evolución de la presión arterial pulmonar (mPAP) y presión arterial sistémica (mPAS) durante prueba de dosis cinaciguat ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$, 10 minutos infusión, ev. sistémico). Una prueba de dosis en un animal.

Posteriormente se aumentó a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ev. sistémico por 10 minutos, mostrando disminuciones en mPAP (43 % menor al valor basal) y mPAS (19 % menor al valor basal) (Figura 3).

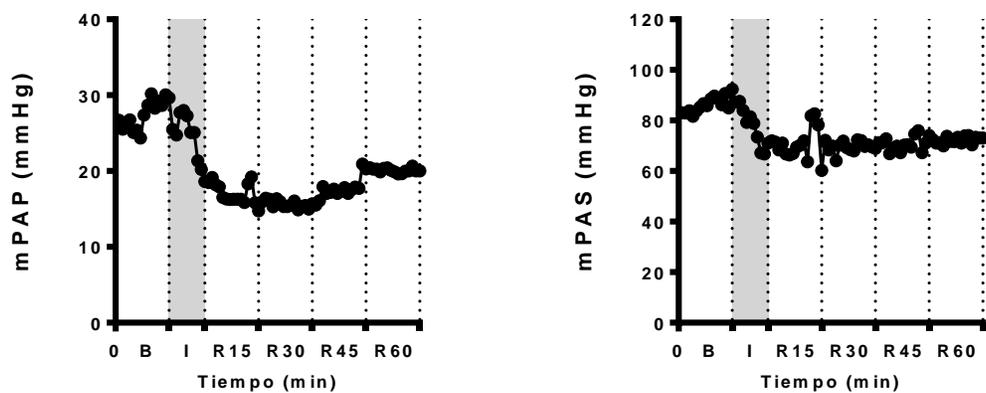


Figura 3. Evolución de la presión arterial pulmonar (mPAP) y presión arterial sistémica (mPAS) durante prueba de dosis cinaciguat ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$, 10 minutos infusión, ev. sistémico). Una prueba de dosis en un animal.



Vía pulmonar (Swan-Ganz)

A la vista de los resultados anteriores, se decidió utilizar el catéter Swan-Ganz como vía de infusión ya que entrega el medicamento directamente en el territorio pulmonar. Se administró la mitad de la dosis que había causado disminución en mPAP ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), inyectando $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ por 10 minutos, dosis que no mostraron efectos evidentes en las variables cardiovasculares (Figura 4).

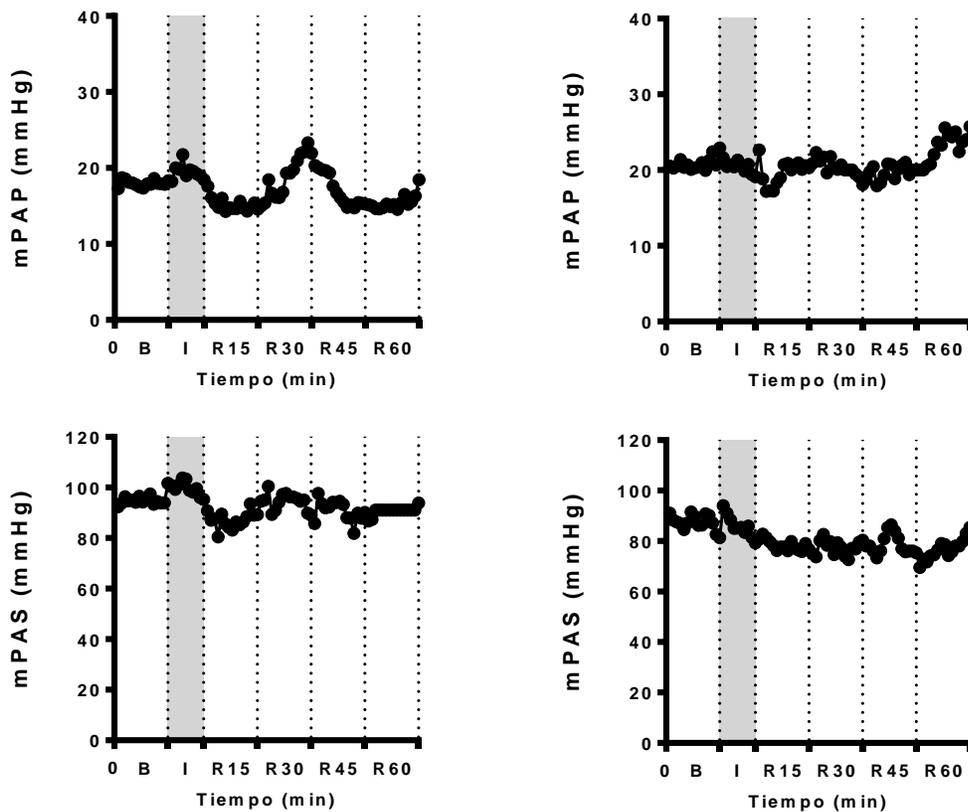


Figura 4. Evolución de la presión arterial pulmonar (mPAP) y presión arterial sistémica (mPAS) durante prueba de dosis cinaciguat ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$, 10 minutos infusión, ev. pulmonar). Una prueba de dosis por cada animal.

Se decidió entonces aumentar a $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ y disminuir a 3 minutos la infusión para lograr el efecto deseado en un menor tiempo. Con este procedimiento se logró una

disminución de mPAP de 40 % menor al valor basal, produciendo una disminución de solo 10 % menor al valor basal en la mPAS ($p \leq 0,05$) (Figura 5).

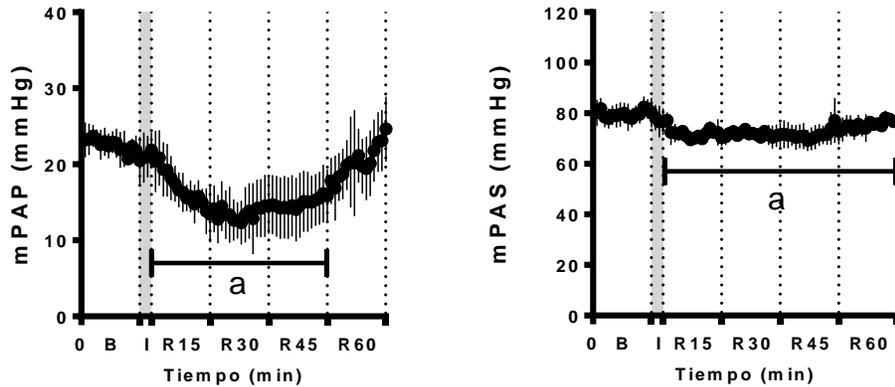


Figura 5. Evolución de la presión arterial pulmonar (mPAP) y presión arterial sistémica (mPAS) durante prueba de dosis cinaciguat ($35 \mu\text{g kg}^{-1}$, 3 minutos infusión, ev. pulmonar). 3 pruebas de dosis, en un animal se realizaron dos pruebas, mientras que en el otro sólo se realizó sólo una. **a** vs. valor basal, ANOVA de una vía, *post-hoc* Dunnett, $p \leq 0,05$.

Por lo que, bajo los criterios de lograr el efecto de una disminución de la mPAP en un menor tiempo de infusión, se determinó que la dosis de cinaciguat a utilizar era de $35 \mu\text{g kg}^{-1}$.



6. b) Respuesta a administración aguda de cinaciguat

La administración aguda de cinaciguat disminuyó tanto la RVP como la mPAP durante 45 minutos después de su infusión, en relación con sus valores basales ($p \leq 0,05$). Tanto RVS como mPAS también se redujeron, pero sólo durante 30 minutos después de la infusión ($p \leq 0,05$). La FC aumentó durante toda la recuperación ($p \leq 0,05$). El GC no tuvo cambios en ningún período (Figura 6).

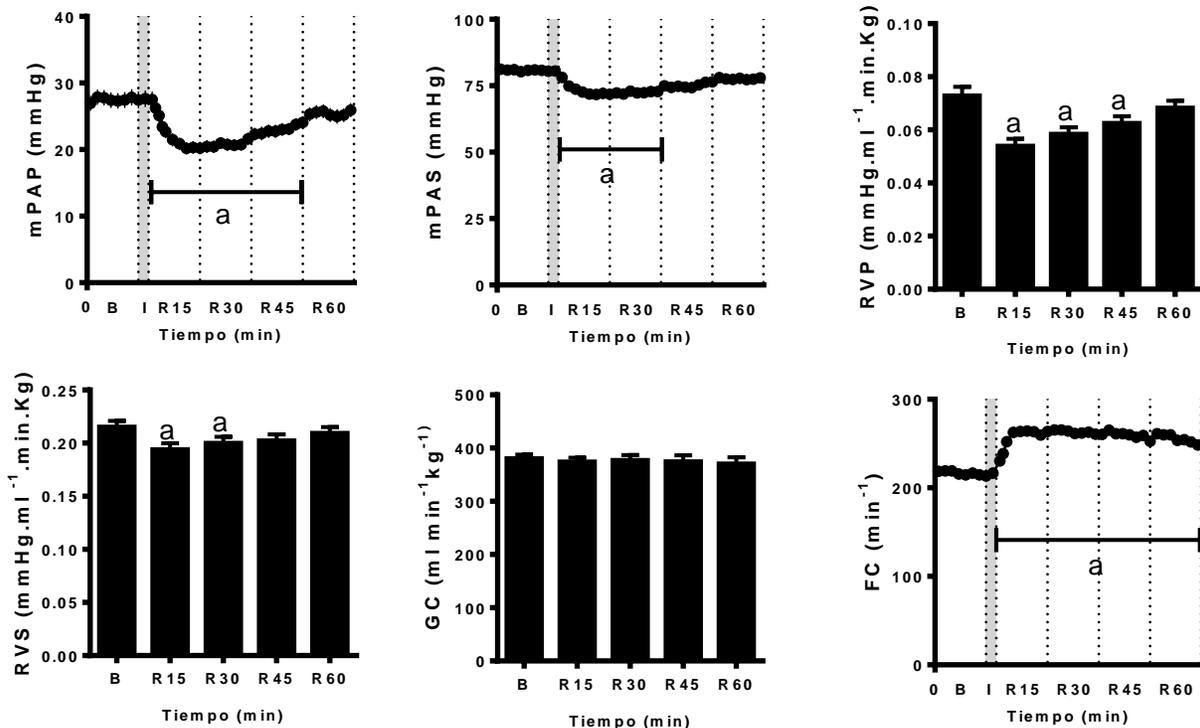


Figura 6. Evolución presión arterial pulmonar (mPAP), presión arterial sistémica (mPAS), resistencia vascular pulmonar (RVP), resistencia vascular sistémica (RVS), gasto cardíaco (GC), frecuencia cardíaca (FR); durante la infusión aguda diaria de cinaciguat ($35 \mu\text{g kg}^{-1}$, 3 minutos infusión, ev. pulmonar). **a** vs. valor basal, ANOVA de una vía, *post-hoc* Dunnett, $p \leq 0,05$.



6. c) Respuesta a tratamiento crónico con cinaciguat

Cinaciguat como tratamiento crónico logró disminuir basalmente la RVP, la cual fue significativamente menor al grupo control al final del tratamiento, mientras el GC aumentó en el mismo período ($p \leq 0,05$). La mPAP, RVS, mPAS y FC no fueron distintas al grupo control (Figura 7).

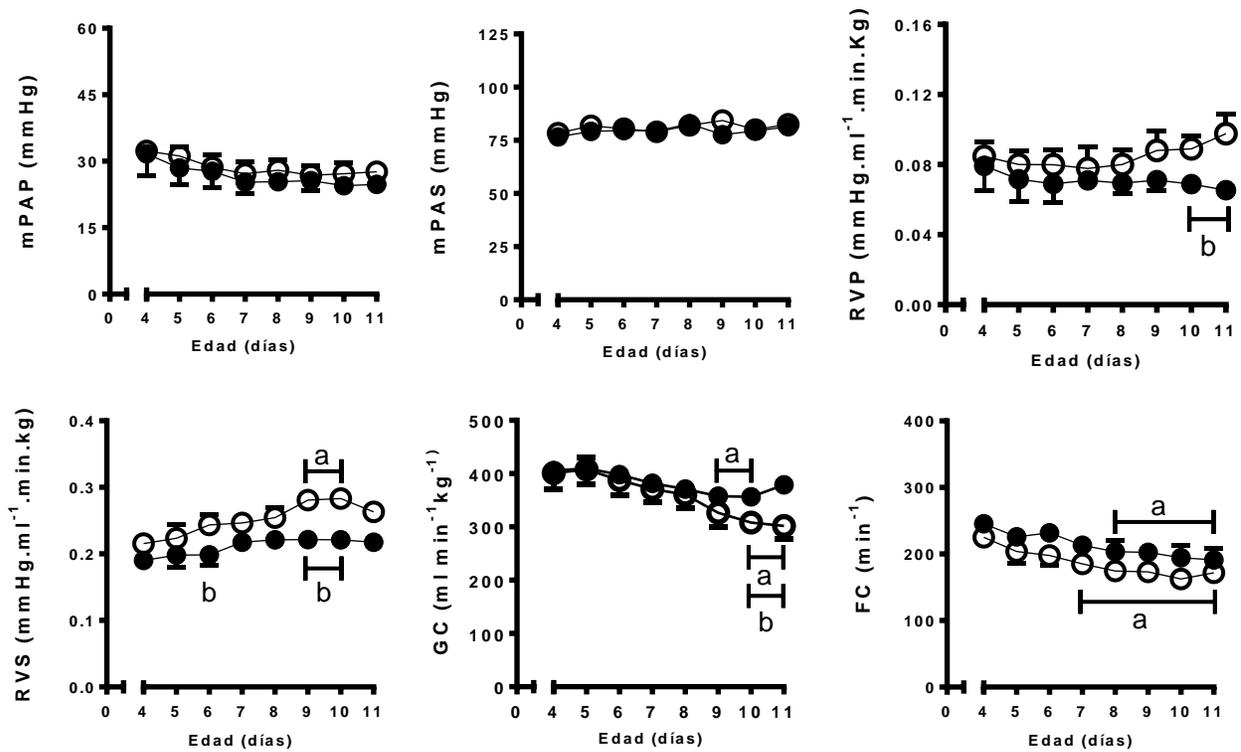


Figura 7. Evolución presión arterial pulmonar (mPAP), presión arterial sistémica (mPAS), resistencia vascular pulmonar (RVP), resistencia vascular sistémica (RVS), gasto cardíaco (GC), frecuencia cardíaca (FR); durante 7 días de tratamiento con cinaciguat ($35 \mu\text{g kg}^{-1}$). Círculos blancos = grupo control, círculos negros = grupo cinaciguat. **a** vs. valor basal mismo grupo, **b** vs. grupo control en mismo tiempo, ANOVA de dos vías, *post-hoc* Newman-Keuls, $p \leq 0,05$.



6. d) Respuesta a hipoxia aguda isocápnic sobreimpuesta

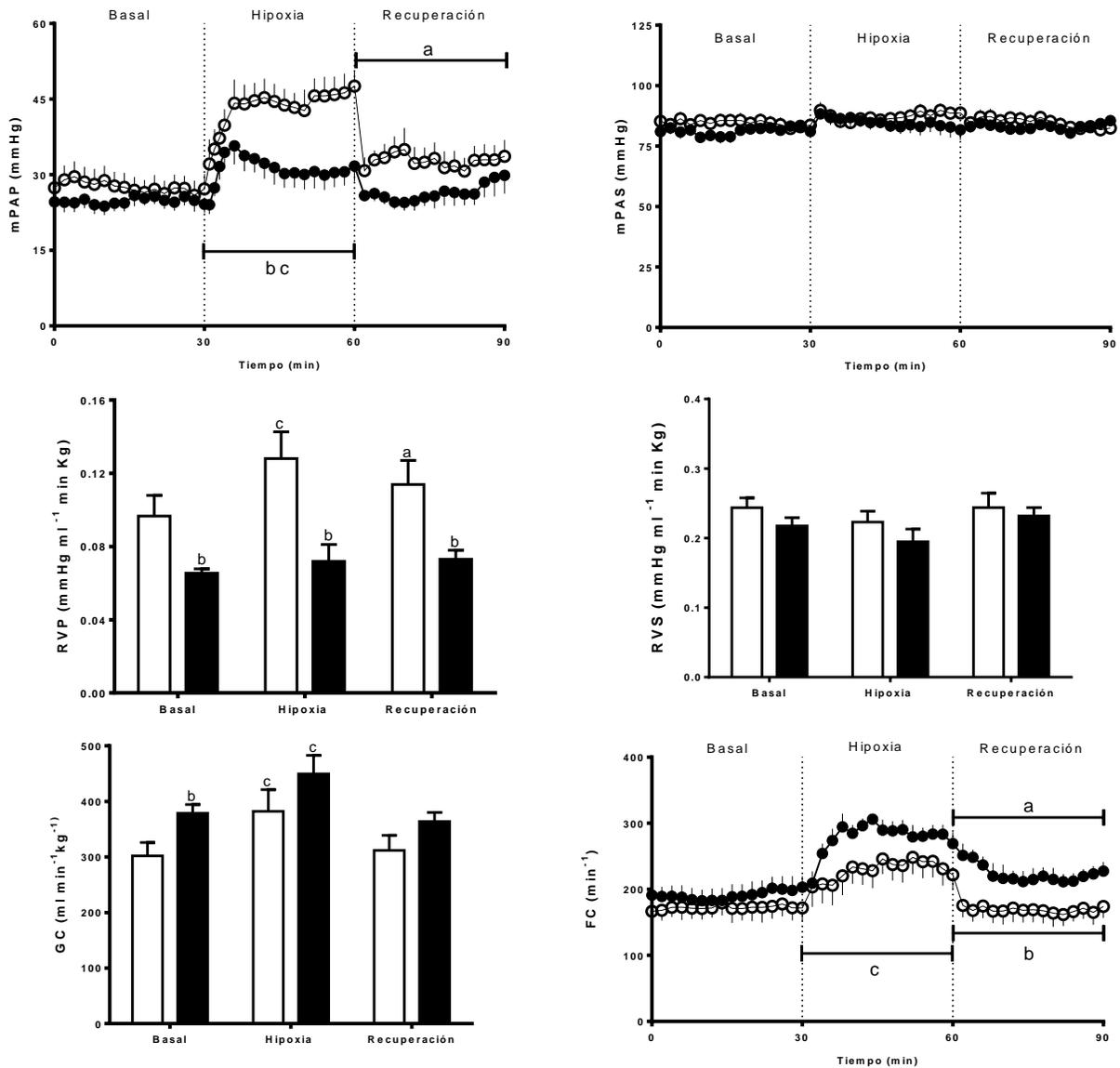


Figura 8. Evolución presión arterial pulmonar (mPAP), presión arterial sistémica (mPAS), resistencia vascular pulmonar (RVP), resistencia vascular sistémica (RVS), gasto cardíaco (GC), frecuencia cardíaca (FR); durante hipoxia aguda sobreimpuesta. Círculos y barras blancas = grupo control, círculos y barras negras = grupo cinaciguat. **a** vs. valor basal mismo grupo, **b** vs. grupo control mismo tiempo, **c** = hipoxia vs. basal y recuperación mismo grupo, ANOVA de dos vías, *post-hoc* Newman-Keuls, $p \leq 0,05$.

Durante la hipoxia aguda sobreimpuesta se evidenció una marcada diferencia significativa al comparar los grupos, con menor aumento de la RVP y la mPAP en el grupo tratado con cinaciguat ($p \leq 0,05$). La RVS, mPAS y FC no tuvieron diferencias con el grupo control. Sin embargo, la FC fue mayor en el grupo cinaciguat en relación con el grupo control durante el período de recuperación ($p \leq 0,05$) (Figura 8).

Se obtuvo una hipoxia isocápnica en ambos grupos de corderos, encontrando sólo una diferencia en la [Hb], donde el grupo cinaciguat fue significativamente mayor durante la recuperación ($p \leq 0,05$) (Tabla 1).

		Basal	Hipoxia	Recuperación
pHa	Control	7,486 ± 0,012	7,452 ± 0,025	7,440 ± 0,055
	Cinaciguat	7,484 ± 0,027	7,466 ± 0,083	7,452 ± 0,057
PaO ₂ (mmHg)	Control	43,0 ± 1,7	29,8 ± 0,6 c	46,9 ± 1,6
	Cinaciguat	42,4 ± 4,1	29,6 ± 2,0 c	44,3 ± 3,0
PaCO ₂ (mmHg)	Control	29,0 ± 2,2	28,1 ± 2,7	26,5 ± 2,8
	Cinaciguat	30,7 ± 1,9	30,5 ± 2,6	29,2 ± 2,6
Sat Hb (%)	Control	73,2 ± 2,2	47,6 ± 4,5 c	75,7 ± 2,6
	Cinaciguat	75,6 ± 6,5	43,1 ± 8,0 c	78,5 ± 7,5
[Hb] (g dl ⁻¹)	Control	10,8 ± 1,7	10,9 ± 1,8	10,4 ± 1,8
	Cinaciguat	11,8 ± 1,4	12,6 ± 1,2 a	12,5 ± 0,8 ab

Tabla 1. Evolución gases arteriales pH arterial (pHa), presión parcial de oxígeno arterial (PaO₂), presión parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂), concentración de hemoglobina ([Hb]) y porcentaje de saturación de la hemoglobina (Sat Hb %). **a** vs. valor basal mismo grupo, **b** vs. grupo control mismo tiempo, **c** = hipoxia vs. basal y recuperación mismo grupo, ANOVA de dos vías, *post-hoc* Newman-Keuls, $p \leq 0,05$.

En la eutanasia los pesos corporales fueron: $5,90 \pm 0,25$ kg grupo tratado con cinaciguat y $5,68 \pm 0,36$ kg grupo control, sin diferencias significativas entre grupos.

6. e) Índice de hipertrofia cardíaco derecho (IHD)

El IHD de los RN tratados con cinaciguat fue significativamente menor al del grupo control ($0,37 \pm 0,05$ UR vs. $0,44 \pm 0,04$ UR, respectivamente, $p \leq 0,05$) (Figura 9).

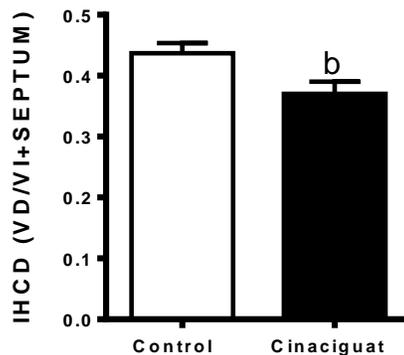


Figura 9. Análisis índice hipertrofia cardíaca izquierda (IHD) en corazones de corderos controles y tratados con cinaciguat. Barra blanca = grupo control, barra negra = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

6. f) Histología

Con respecto a las arterias pequeñas pulmonares (APP), evidencian una menor capa muscular ($27,15 \pm 1,38$ % vs. $40,01 \pm 4,17$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$) y de adventicia ($32,25 \pm 3,98$ % vs. $48,62 \pm 1,92$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$) en los animales tratados con cinaciguat en relación con los controles (Figura 10).

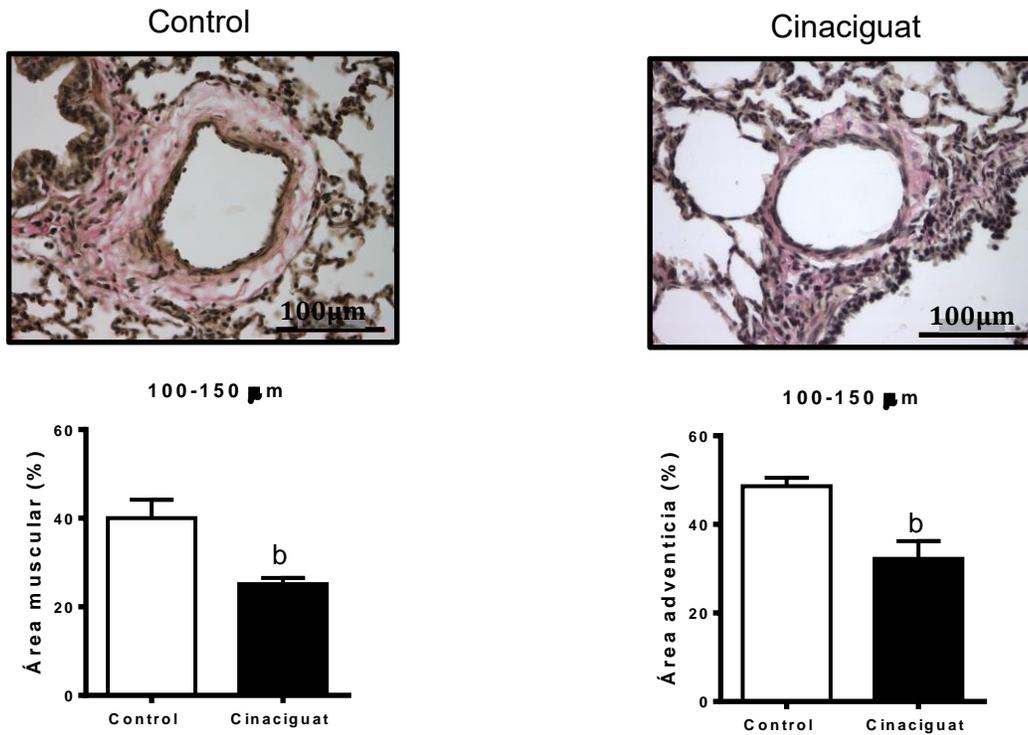


Figura 10. Análisis histológico en APP (100-150 μ m) en corderos controles y tratados con cinaciguat. Barras blancas = grupo control, barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

6. g) Inmunohistoquímica

Hubo un aumento significativo en los patrones de división celular medidos como células Ki67 positivas (%) en los corderos tratados con cinaciguat vs. controles (11,78 \pm 1,88 % vs. 3,96 \pm 0,90 %, respectivamente, $p \leq 0,05$) (Figura 11).

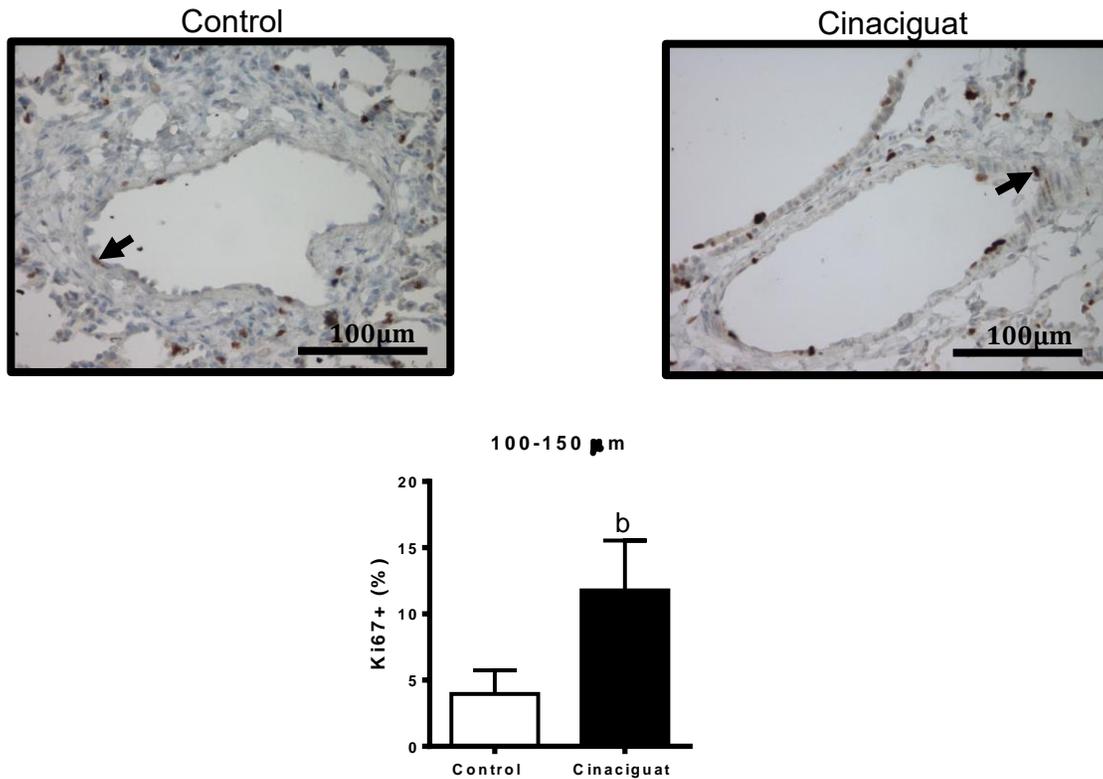


Figura 11. Análisis inmunohistoquímico (% células Ki67 positivas) en APP (100-150 μm) en corderos controles y tratados con cinaciguat. Barra blanca = grupo control, barra negra = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

6. h) Reactividad vascular: respuesta a vasoconstrictores

Con respecto a la función vasoconstrictora de las APP, en los corderos tratados con cinaciguat comparado con los corderos controles, hubo una tensión máxima significativamente menor frente a KCl ($1,71 \pm 0,10$ N/m vs. $2,18 \pm 0,04$ N/m, respectivamente, $p \leq 0,05$) y una significativa menor contracción (% K_{max}) frente a U46619 ($32,26 \pm 6,13$ % vs. $92,47 \pm 6,38$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$), sin cambios en sus sensibilidades (EC_{50} CCR KCL: $22,77 \pm 10,35$ mM vs. $31,14 \pm 1,23$ mM,

respectivamente; pD_2 CCR U46619: $6,25 \pm 0,40$ UR vs. $7,08 \pm 0,15$ UR, respectivamente) (Figura 12). Por otra parte, hubo una contracción (% K_{max}) significativamente mayor frente a ET-1 ($543,70 \pm 58,75$ % vs. $428,10 \pm 81,31$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$) y 5HT ($478,10 \pm 33,12$ % vs. $309,30 \pm 13,13$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$), sin cambios en sus sensibilidades (pD_2 CCR ET-1: $8,46 \pm 0,17$ UR vs. $7,88 \pm 0,30$ UR, respectivamente; pD_2 CCR 5HT: $6,52 \pm 0,15$ UR vs. $6,56 \pm 0,10$ UR, respectivamente) (Figura 13).

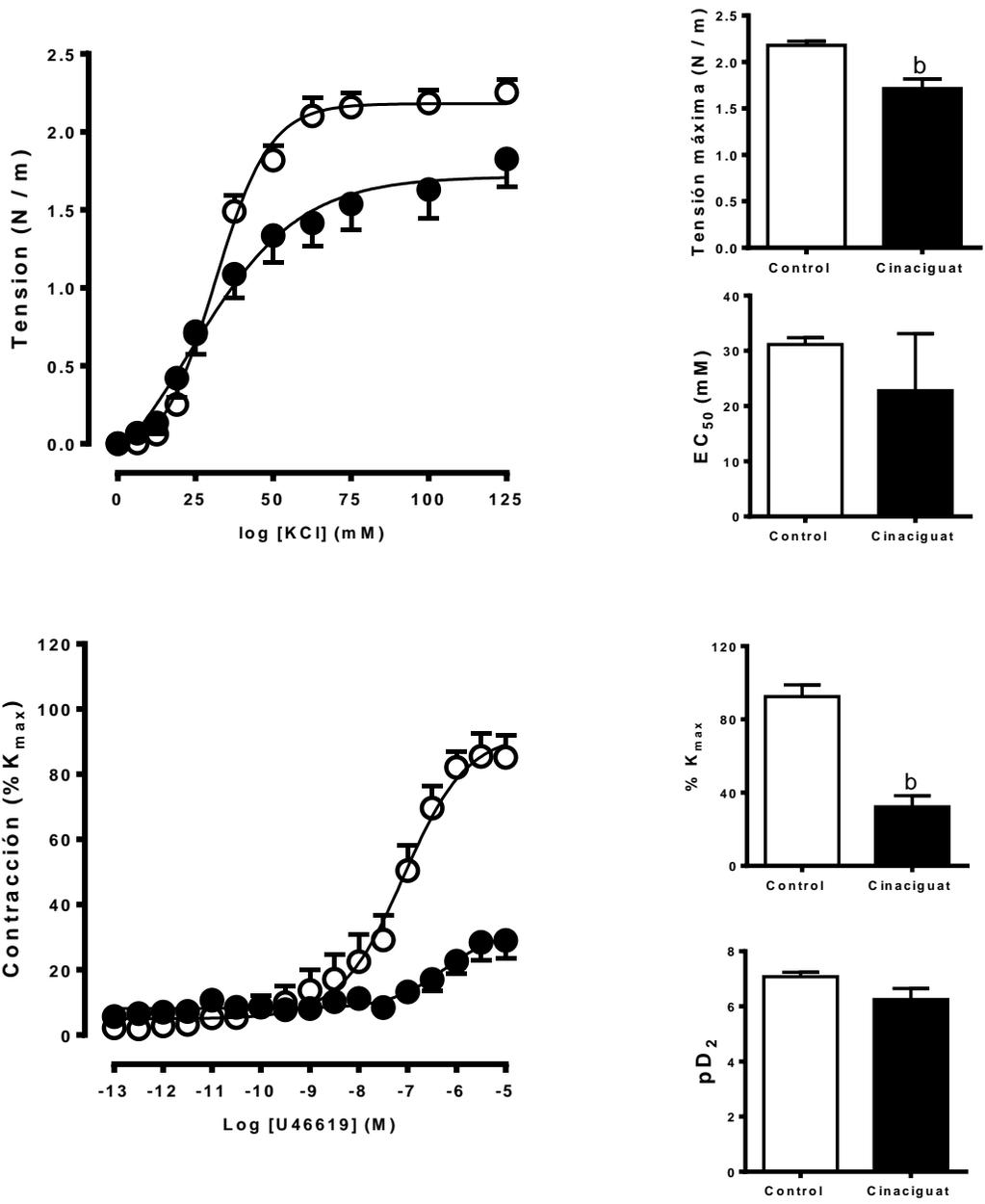


Figura 12. Reactividad vascular a KCl y U46619 en APP. Tensión máxima (N/m) y sensibilidad (EC₅₀) en CCR frente a KCl. Porcentaje de K_{max} y sensibilidad (pD₂) en CCR frente a U46619. Círculos y barras blancas = grupo control, círculos y barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, p ≤ 0,05.

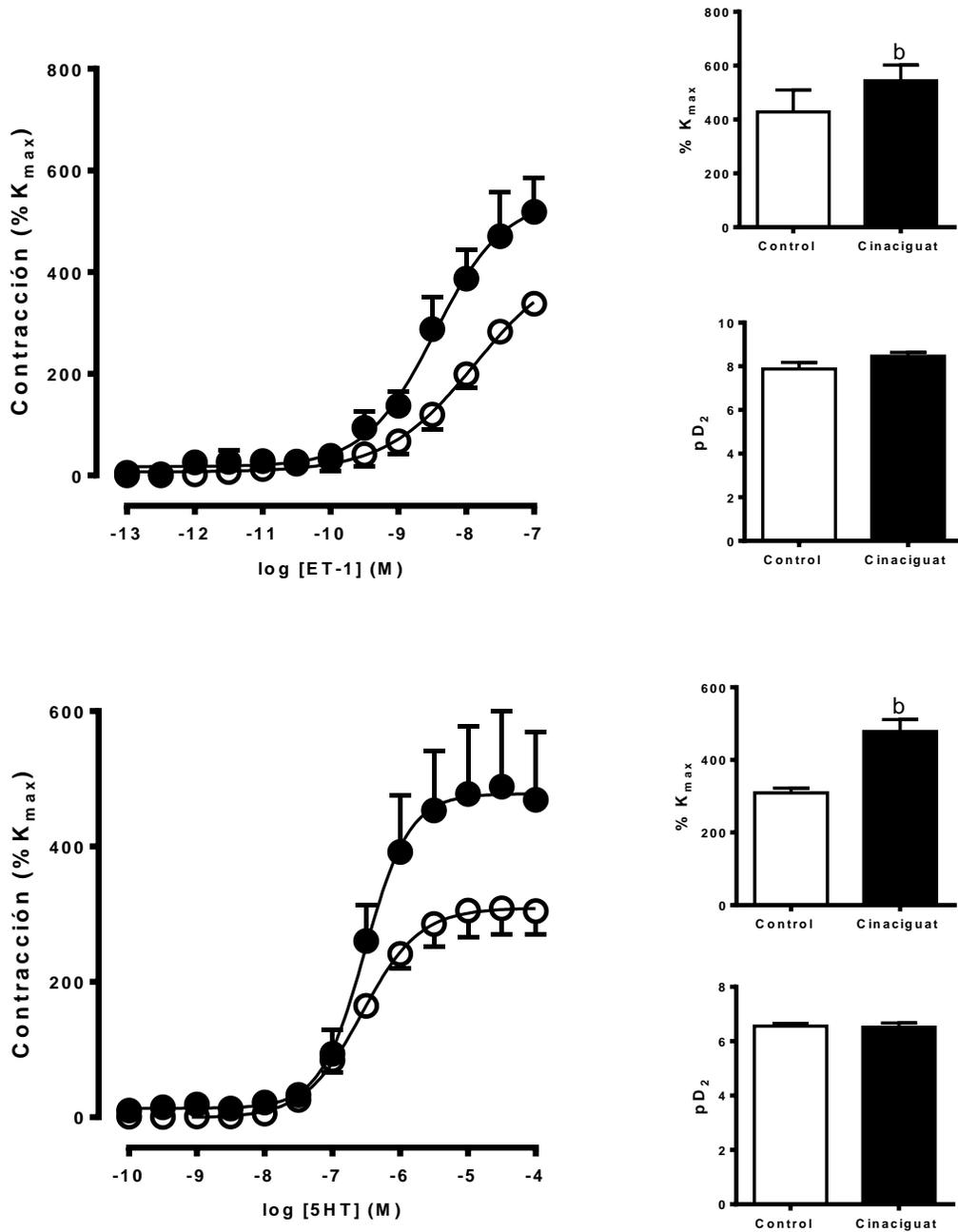


Figura 13. Reactividad vascular a ET-1 y 5HT en APP. Porcentaje de K_{max} y sensibilidad (pD₂) en CCRs frente a ET-1 y 5HT. Círculos y barras blancas = grupo control, círculos y barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, p ≤ 0,05.



6. i) Reactividad vascular: respuesta a vasodilatadores

Con respecto a la respuesta a fármacos dilatadores, las APP de corderos tratados con cinaciguat al compararse con corderos controles mostraron vasorelajaciones significativamente mayores frente a SNP ($69,49 \pm 6,06$ % vs. $42,70 \pm 6,33$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$) y a NS1619 ($42,58 \pm 7,83$ % vs. $20,61 \pm 8,54$ %, respectivamente, $p \leq 0,05$), sin presentar cambios en sus sensibilidades (pD_2 CCR SNP: $6,23 \pm 0,73$ UR vs. $4,97 \pm 0,17$ UR, respectivamente; pD_2 CCR NS1619: $7,32 \pm 0,31$ UR vs. $7,72 \pm 0,48$ UR, respectivamente) (Figura 14). Más aún, hubo una sensibilidad significativamente mayor frente a sildenafil (pD_2 : $8,70 \pm 0,29$ UR vs. $7,10 \pm 0,18$ UR, respectivamente, $p \leq 0,05$), sin cambios en su relajación máxima ($74,10 \pm 4,55$ % vs. $72,94 \pm 5,32$ %, respectivamente) (Figura 15).

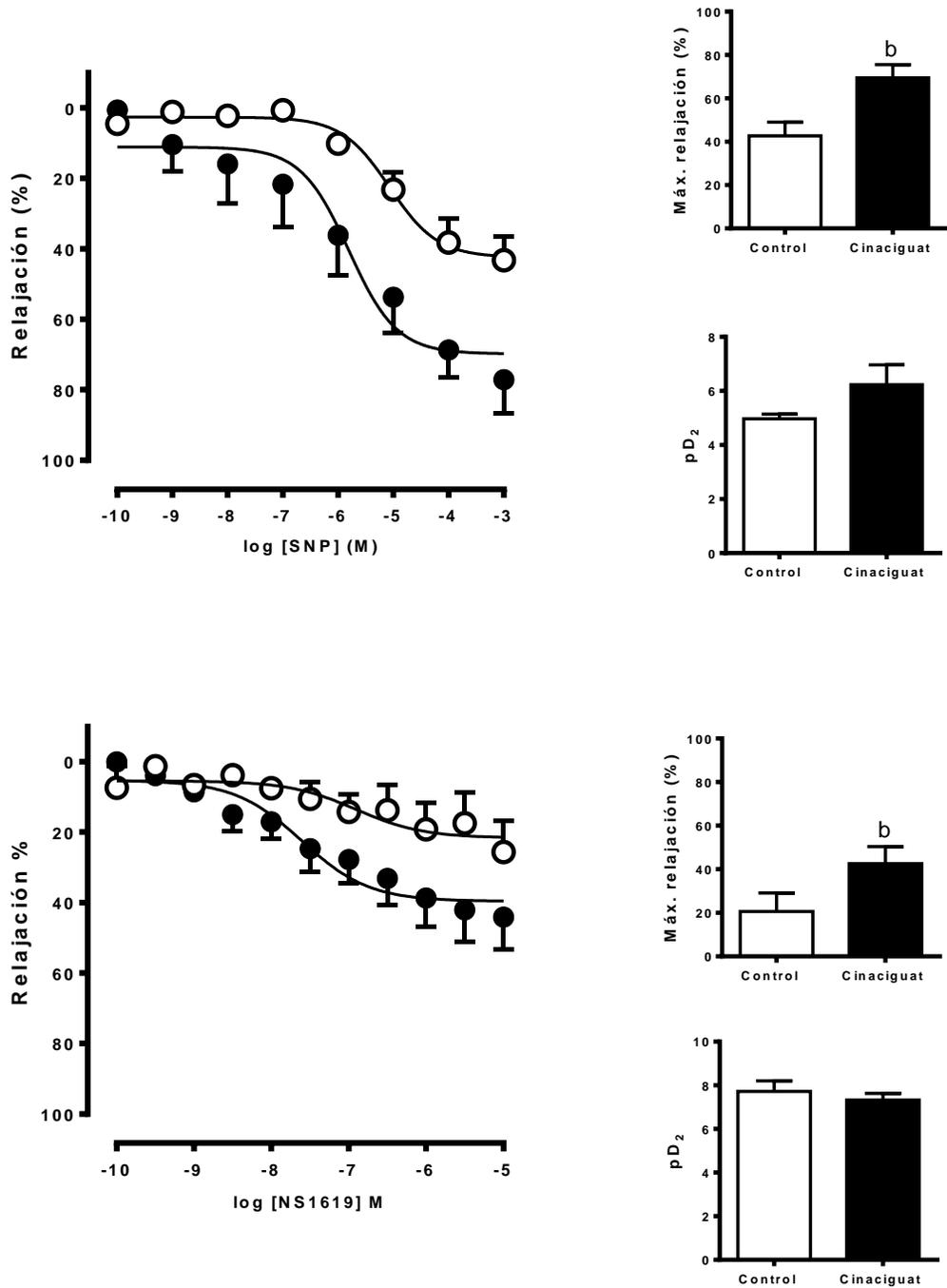


Figura 14. Reactividad vascular a SNP y NS1619 en APP. Máxima relajación (%) y sensibilidad (pD_2) en CCRs frente a SNP y NS1619. Círculos y barras blancas = grupo control, círculos y barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

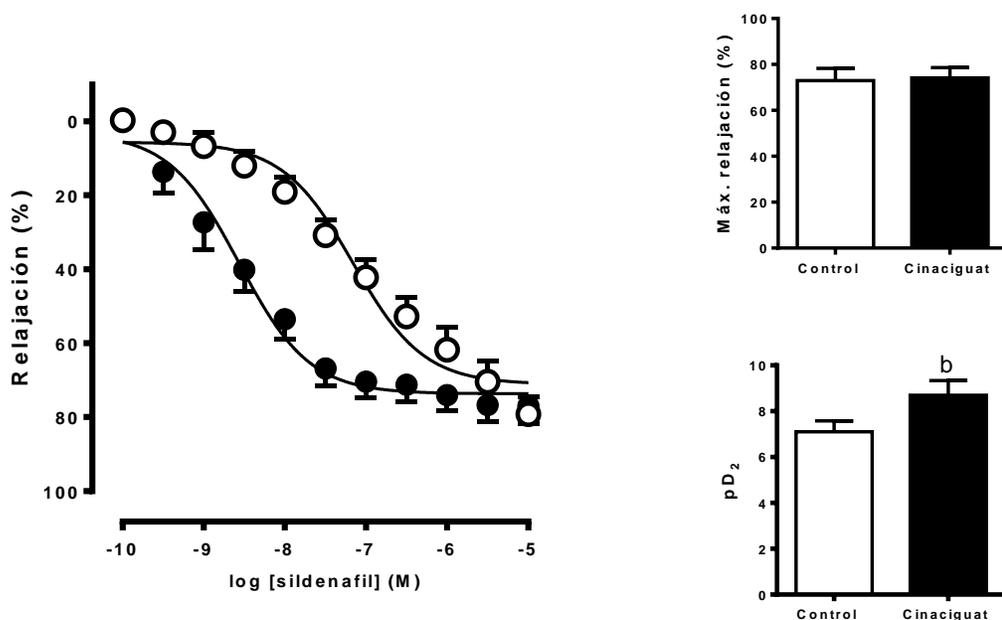


Figura 15. Reactividad vascular a sildenafil en APP. Máxima relajación (%) y sensibilidad (pD₂) en CCR frente a sildenafil. Círculos y barras blancas = grupo control, círculos y barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

6. j) Expresión proteica

La expresión proteica de eNOS (eNOS / β -actina) en los animales tratados con cinaciguat fue significativamente menor al compararse a los animales controles ($0,55 \pm 0,07$ UR vs. $0,96 \pm 0,14$ UR, respectivamente, $p \leq 0,05$) y significativamente mayor para BK_{Ca} (BK_{Ca} / β -actina) ($2,25 \pm 0,24$ UR vs. $1,23 \pm 0,18$ UR, respectivamente, $p \leq 0,05$). En contraste, no hubo diferencias entre ambos grupos estudiados en los cambios de expresión proteica de las subunidades α (sGC α 1 / β -actina) (cinaciguat $0,33 \pm 0,03$ UR vs. control $0,52 \pm 0,09$ UR) y β (sGC β 1 / β -actina) (cinaciguat $0,35 \pm 0,05$ UR vs. control $0,29 \pm 0,02$ UR) de sGC, PDE5 (PDE5 / β -actina) (cinaciguat $0,57$

$\pm 0,07$ UR vs. control $0,69 \pm 0,08$ UR) y PKG-1 (PKG-1 / β -actina) (cinaciguat $1,32 \pm 0,11$ UR vs. control $1,22 \pm 0,07$ UR) (Figura 16).

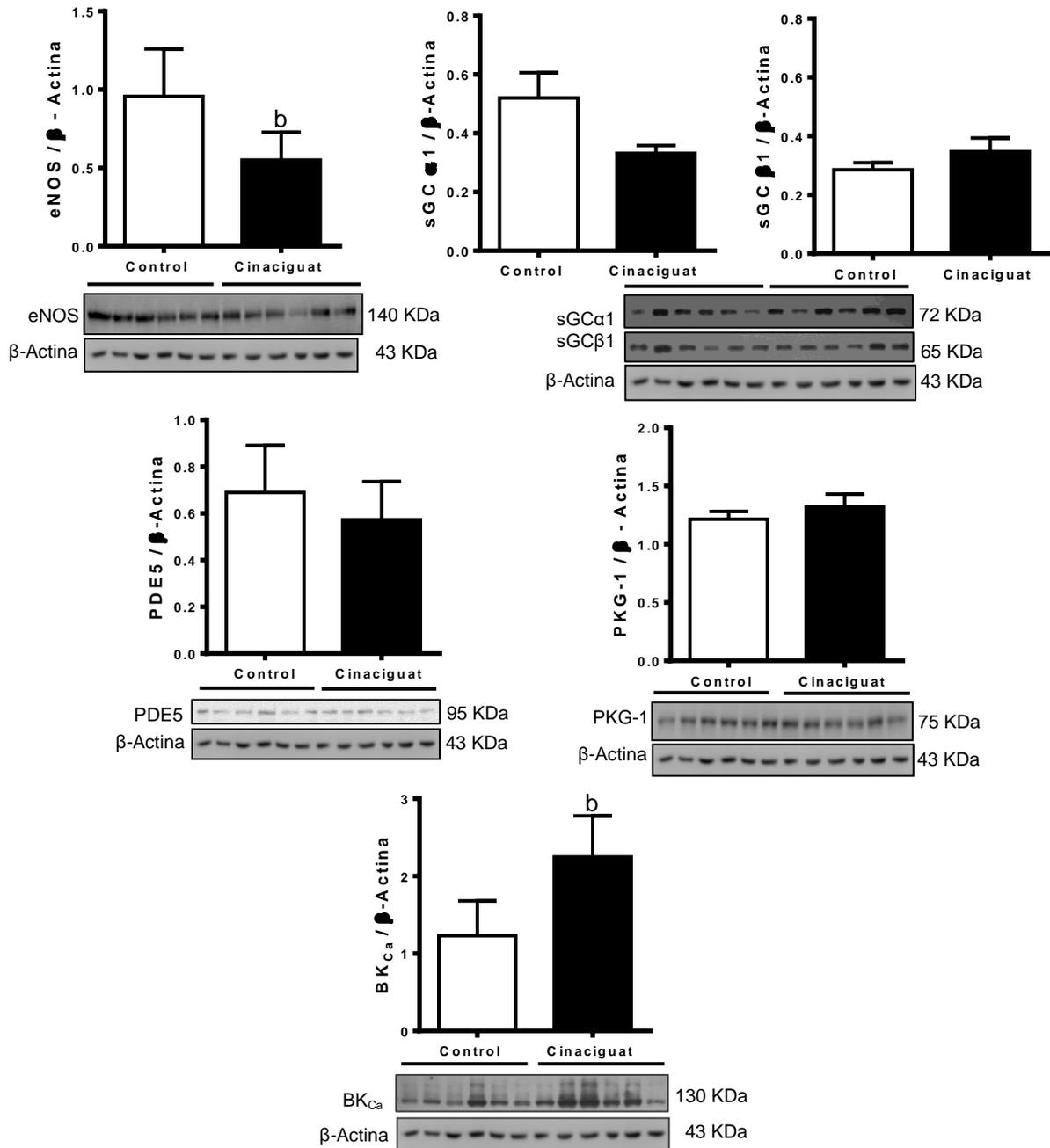


Figura 16. Expresión proteica de eNOS, sGC α y sGC β , PDE5, PKG-1 y BK_{Ca} en tejido pulmonar. Barras blancas = grupo control, barras negras = grupo cinaciguat. **b** vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



7. Discusión

La administración de cinaciguat (BAY-582667) en corderos neonatos crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares ocasionó una disminución de la RVP y mPAP durante su administración aguda diaria. Luego del tratamiento crónico de 7 días, cinaciguat originó una disminución de la RVP, sin embargo, no causó una disminución de la hipertensión pulmonar, ya que en paralelo produjo un aumento en el gasto cardíaco. Pero, en el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta ocurrió un notable menor incremento de la RVP y mPAP, efectos corroborados por el menor tono vascular y menor remodelamiento vascular pulmonar junto con una disminución de la hipertrofia cardíaca derecha. Además, hubo un aumento en la expresión proteica de una de las proteínas relacionadas a mecanismos de vasodilatación pulmonar (BK_{Ca} / β -actina). Por lo que estos resultados indican que la hipótesis planteada es parcialmente ratificada.

Cabe destacar que en la hipertensión pulmonar neonatal existe un componente de género, siendo más alto el porcentaje de niños recién nacidos que de niñas con esta patología, a diferencia de la hipertensión pulmonar en adultos, la cual tiene una alta incidencia en mujeres (Hernández-Díaz et al, 2007; Herrera S. *et al.*, 2016). No obstante, tanto en la prueba de dosis, así como en los animales tratados con cinaciguat o vehículo en esta Tesis, la proporción de hembras y machos es aproximadamente la misma.

En esta Tesis se determinó la dosis necesaria para lograr los efectos deseados en una administración aguda (disminuir la mPAP y no causar una disminución importante de la mSAP), y luego utilizar dicha dosis para comenzar el tratamiento crónico. Para ello se utilizaron dos animales para prueba de dosis. Cinaciguat administrado de forma aguda en dosis mayores y por vía sistémica (50 y $100 \mu\text{g kg}^{-1}$) disminuyó la mPAP, pero a su vez produjo disminución de la mPAS, al igual que los efectos encontrados por Evgenov *et al.*, 2007, quienes publicaron que la administración aguda de cinaciguat, en dosis de $0,01$ a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ en forma de aerosol, en ovejas cuyos pesos variaban entre 16 - 35 kg con hipertensión pulmonar inducida con tromboxano, disminuyó la PAP y la RVP, variables deseables para nuestro estudio, pero en las dosis mayores produjo también disminuciones de la PAS y la RVS. Por otra parte, el uso de cinaciguat en el período neonatal se limita a un trabajo publicado por Chester *et al.*, 2011, que también utiliza corderos recién nacidos con hipertensión pulmonar, producida por aumento del flujo pulmonar resultado de la ligadura del *ductus arteriosus in útero*, en el 86% de gestación. Estos corderos recién nacidos, pretérminos, con ventilación mecánica y altamente instrumentados, mostraron que cinaciguat, administrado agudamente en dosis que variaron entre 5 a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, redujo la RVP y la PAP, con aumento del flujo sanguíneo pulmonar y frecuencia cardíaca. No obstante, no indican si las dosis utilizadas causaron hipotensión sistémica, ya que cualquier baja en la PAS fue abolida mediante el uso de líquidos endovenosos. Otro estudio realizado en humanos adultos sanos (Frey *et al.*, 2008), estableció que la infusión aguda de cinaciguat, durante 4 horas, en dosis bajas (50 - $250 \mu\text{g x h}$) disminuyó la presión diastólica, aumentó la frecuencia cardíaca, mientras que en dosis mayores (150 - $250 \mu\text{g x h}$) disminuyó la presión arterial media. En este mismo estudio



se determinó que cinaciguat alcanza valores menores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ luego de 30 minutos terminada la infusión.

Ya que las administraciones sistémicas de cinaciguat utilizadas en esta Tesis mostraron disminuciones importantes de la mPAS, se decidió utilizar el catéter Swan-Ganz como vía de infusión, logrando que el medicamento llegara directamente en el territorio blanco (vasculatura pulmonar), disminuyendo los posibles efectos sistémicos. Por lo que, bajo los criterios de lograr el efecto de una disminución de la mPAP en un menor tiempo de infusión, se determinó que la dosis de cinaciguat a utilizar era de $35 \mu\text{g kg}^{-1}$. la cual tuvo efectos menores en la circulación sistémica durante la administración aguda y esperando que no produzca hipotensión sistémica en la administración crónica, resultado que así aconteció.

La dosis determinada ($35 \mu\text{g kg}^{-1}$) vía catéter Swan-Ganz tuvo efectos semejantes a las pruebas de dosis mayores vía sistémica probadas en esta Tesis, y a las de la literatura consultada (Evgenov *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2008; Chester *et al.*, 2011), disminuyendo mPAP y RVP en tiempos consistentes con la vida media de cinaciguat (30 minutos) (Frey *et al.*, 2008), sin que la baja de mPAS y RVS comprometieran la función cardiovascular. Además, luego de la infusión de cinaciguat, aumentó la FC en los corderos RN, respuesta que se explicaría por un baroreflejo causado por la disminución de la presión sistémica, pero sin afectar el gasto cardíaco en los animales tratados con cinaciguat. La posible explicación a estos resultados es que la caída de presión censada a nivel de baroreceptores en la vasculatura (seno carotídeo y cayado aórtico), llevan su impulso vía glossofaríngeo a neuronas del *nucleus tractus solitarius*

(NTS) localizado en el bulbo raquídeo. El NTS indirectamente modula la actividad de las neuronas simpáticas en diferentes regiones del sistema nervioso central, regulando el control autonómico del corazón (Dampney, 2016).

Desde centros de integración simpática, se activan a neuronas preganglionares simpáticas, las cuales distribuyen sus fibras vía médula espinal, donde excitan a neuronas preganglionares del sistema nervioso central, inervando al corazón. En el corazón las fibras de estas neuronas se anastomosan o adosan a nervios cardíacos o llegan directamente al plexo cardíaco, donde los nervios simpáticos liberarían noradrenalina en sus terminales, estimulando los receptores β_1 -adrenérgicos presentes en las células cardíacas, produciendo taquicardia (Guyton & Hall, 2016). Sin embargo, el estímulo que produjo la taquicardia no fue suficiente para aumentar el gasto cardíaco, en los animales tratados con cinaciguat. Acorde a esto, Reinke *et al.*, 2015 utilizó cultivo de células cardíacas (ventrículos) de ratas adultas donde probó diversas dosis agudas de cinaciguat (10^{-10} - 10^{-5} M) cuyos resultados se midieron 5 minutos después de dar cada concentración, donde no se demostró efectos inotrópicos positivos. A la luz de los resultados obtenidos y discusión planteada sobre las pruebas de dosis y administración aguda de cinaciguat, se destaca que la dosis determinada logró los efectos cardiovasculares planteados en la hipótesis (disminuir mPAP y RVP) sin afectar en forma deletérea la mPAS y RVP.

Al término del tratamiento crónico, cinaciguat logró reducir la RVP, fenómeno que será explicado posteriormente ligado a los resultados histológicos y miografías de APP, sin embargo, el aumento del gasto cardíaco al final del tratamiento crónico en los corderos

tratados con cinaciguat, evitó el descenso de la presión pulmonar neonatal. Tanto mPAS, como RVS y FC, no tuvieron diferencias significativas con el grupo control.

En el mejor de nuestro conocimiento sólo algunos trabajos han demostrado efectos *in vivo* durante un tratamiento crónico de cinaciguat, pero se diferencian de nuestro trabajo en que ocupan otro modelo animal de estudio (ratas), buscan tratar otras patologías, en animales adultos, y con una menor cantidad de variables cardiovasculares estudiadas. Mátyás *et al.*, 2015, indujeron diabetes *mellitus* en ratas de 8 semanas, luego fueron tratadas con cinaciguat ($10 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$) por 8 semanas. Se midió frecuencia cardíaca y presión arterial media como variables *in vivo*, las cuales no mostraron diferencias con el grupo control. Németh *et al.*, 2016 indujo hipertrofia cardíaca izquierda, mediante constricción de la aorta abdominal en ratas de 10 semanas, para luego tratar con cinaciguat ($10 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$) durante 6 semanas. Ni la frecuencia cardíaca ni el gasto cardíaco mostraron diferencias con el grupo control, por lo que los resultados obtenidos en esta Tesis toman un mayor valor al entregar más antecedentes e información de variables cardiopulmonares en hipertensión arterial pulmonar neonatal, específicamente en el modelo animal de oveja.

Al comparar los resultados del tratamiento crónico de esta Tesis con estudios realizados en la Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal, en el mismo modelo animal (corderos hipóxicos e hipertensos pulmonares de grandes alturas) y enfermedad (hipertensión pulmonar neonatal), mostró resultados diferentes y similares a los encontrados en esta Tesis. La inducción de la vía HO con hemina ($15 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$) por 10 días, disminuyó la mPAP al final del tratamiento sin afectar las demás

variables *in vivo* (Ebensperger, 2011), siendo el aumento de cGMP (molécula en común con nuestro tratamiento con cinaciguat), entre otros, el causante de estos efectos. Lopez *et al.*, 2016 observó que un tratamiento crónico de 10 días con fasudil ($3 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$), disminuyó la mPAP y RVP, este último resultado semejante al nuestro, sin afectar las demás variables. Esta comparación en el mismo modelo animal, pero con diferentes aproximaciones farmacológicas, son un esfuerzo para solucionar la hipertensión pulmonar neonatal (enfermedad aún sin un tratamiento completamente efectivo), y permite aportar nuevos conocimientos a los ya estudiados por la Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal de la Universidad de Chile.

Como se detalló anteriormente, en esta Tesis hubo una reducción de la RVP al final del tratamiento crónico en el grupo cinaciguat, que al compararse a los valores de corderos de tierras bajas (Lopez *et al.*, 2016) es superior ($0,065 \pm 0,002 \text{ mmHg ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ vs $0,051 \pm 0,004 \text{ mmHg ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, $p \leq 0,05$, respectivamente). El descenso de la RVP en los animales tratados con cinaciguat no repercutió en un descenso de la mPAP, ya que el gasto cardíaco no disminuyó. Frente este fenómeno, planteamos una posible estimulación crónica simpática mediada por la administración de cinaciguat (baroreflejo), que llevaría a reiteradas estimulaciones de las glándulas suprarrenales, liberando catecolaminas, las cuales aumentarían finalmente la fuerza contráctil del corazón, y por lo tanto, aumentarían el gasto cardíaco. El estudio de Frey *et al.*, 2008, entrega apoyo a este planteamiento, indicando que la liberación de noradrenalina aumento luego de 2 horas de una infusión de cinaciguat ($50\text{-}200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), por lo que podríamos plantear un posible rol crónico de catecolaminas en la respuesta aumentada del gasto cardíaco. Sumado a esto, cinaciguat ha sido descrito como un

fármaco que produciría fosforilaciones en diversas moléculas blanco, una de ellas podría ser la proteína titin (no medida en esta Tesis, pero que podría ser un área de proyección en futuros estudios). Con respecto a titin, Hamdani & Paulus, 2013 describen que esta enzima al ser fosforilada por PKG-1, puede aumentar la distensión de las células cardíacas, aumentando el llenado ventricular y por ende de la fuerza contráctil (ley de Starling), más aún cuando se ha descrito que los ventrículos derechos de pacientes con hipertensión arterial pulmonar tienen esta proteína con menor fosforilación comparada a pacientes controles (Rain *et al.*, 2013). Por ende, planteamos que una mayor fosforilación de la proteína titin en los corazones de los animales tratados con cinaciguat, junto con una reiterada estimulación simpática mediada por las disminuciones en las presiones sistémicas (baroreflejo), podrían llevar a un aumento del gasto cardíaco durante el tratamiento crónico.

Cabe recordar que el experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta fue planteado para replicar las condiciones adversas de ventilación/perfusión que sufren los neonatos humanos cuando cursan con disminuciones agudas de la PO_2 con los aumentos respectivos de la vasoconstricción vascular pulmonar y de la mPAP durante el transcurso de la hipertensión pulmonar en niños recién nacidos. En esta Tesis, durante el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta, se observó un notable menor aumento de la RVP, que limitó marcadamente el incremento de mPAP en los animales tratados con cinaciguat, además de no afectar las variables sistémicas (mPAS, RVS, FC y GC) vs. los controles. En ellos, la frecuencia cardíaca fue la única variable que durante la recuperación fue significativamente mayor al grupo control. Estos resultados toman importancia al compararse con los pocos estudios que muestran cómo se comportan

las variables cardiovasculares durante un episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta, es decir con los datos históricos de la Unidad de Fisiología y Fisiopatología Perinatal de la Universidad de Chile. Ebensperger, 2011, administró hemina, inductor de la enzima HO ($15 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$), durante 10 días en neonatos de ovejas, 24 horas luego del tratamiento los animales se sometieron a una hipoxia aguda sobreimpuesta, donde los animales tratados con hemina mostraron al igual que esta Tesis una menor mPAP, sin cambios en mPAS y RVS, pero a diferencia de este trabajo, sin cambios en las demás variables pulmonares (RVP y CO) y FC, al compararse a su grupo control. Parrau *et al.*, 2013 administró en forma aguda 2-APB (8 mg kg^{-1}), y realizó una hipoxia aguda sobreimpuesta, comunicando que disminuyó la mPAP y RVP, sin cambios en el CO (igual que esta Tesis). Por último, Lopez *et al.*, 2016, publicó que luego de un tratamiento con fasudil ($3 \text{ mg kg}^{-1} \times \text{día}$) durante 10 días en corderos de tierras altas, durante el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta los animales tratados tuvieron menor mPAP y RVP, sin cambios significativos en mPAS, RVS y GC, al igual que esta Tesis. En este mismo estudio se determinaron variables *in vivo* en corderos controles de tierras bajas, con una mPAP promedio en hipoxia aguda de $25,48 \pm 0,21 \text{ mmHg}$ y RVP de $0,065 \pm \text{ mmHg ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, valores semejantes a los resultados de esta tesis, donde los corderos tratados con cinaciguat durante la hipoxia aguda sobreimpuesta tuvieron un promedio de $24,8 \pm 1,7 \text{ mmHg}$ y RVP de $0,071 \pm 0,009 \text{ mmHg ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. Estudiando con cuidado los resultados obtenidos en este experimento de hipoxia aguda sobreimpuesta, esta Tesis muestra resultados más benéficos que otros tratamientos, al evitar el aumento exacerbado de la mPAP y RVP, no afectando el GC, que se mantiene durante la hipoxia, y sin afectar las variables sistémicas (mPAS y RVS), además la FC aumentada durante la recuperación no afectó el GC del animal.

Una posible explicación a la mayor frecuencia cardíaca observada es plantear que existiera una mayor sensibilidad a nivel de receptores β -adrenérgicos presentes en corazón (no medido en esta Tesis y posible proyección futura) y al aumento de catecolaminas durante la hipoxia aguda sobreimpuesta. Este aumento de catecolaminas liberadas en hipoxia puede ser debida por las reiteradas liberaciones de catecolaminas por el tratamiento de cinaciguat durante 7 días (Frey *et al.*, 2008). Con respecto a la magnitud de la hipoxia, la PO_2 y PCO_2 arteriales en corderos tratados y controles fueron similares y también comparables a los reportados por estudios previos en este mismo modelo animal (Herrera *et al.*, 2007).

Gran parte de los resultados *in vivo* de la hipoxia aguda sobreimpuesta, junto con la menor RVP durante el tratamiento crónico, están en concordancia y pueden deberse a la menor capa muscular y adventicia que se encontró en las arterias pequeñas pulmonares de los animales tratados con cinaciguat en relación con el grupo control. Tanto la capa muscular como la adventicia fueron calculadas y normalizadas por sus propias áreas, respectivamente (Torres *et al.*, 2015). Sí utilizáramos el área externa total de las arterias pequeñas pulmonares para normalizar y determinar el porcentaje de ocupación de las capas muscular y adventicia, podemos generar datos que sub/supra valoran los porcentajes, ya que el grupo cinaciguat tuvo una menor área total en las arterias pequeñas pulmonares (Anexo D), por menor capa muscular y adventicia comparado al grupo control, con mayor capa muscular y adventicia ($27978 \pm 2569 \mu m^2$ vs. $60990 \pm 15451 \mu m^2$, respectivamente, $p \leq 0,05$). Es así como una menor capa adventicia permite una menor rigidez de las arterias, y una menor capa muscular generará menor resistencia al paso de la sangre y por lo tanto disminuya la

RVP (Kuhr *et al.*, 2012). Por lo que el remodelamiento patológico que disminuye el lumen de APP en la hipertensión pulmonar neonatal, puede afectar a la capa muscular lisa, e incluso estimular la migración celular (miofibroblastos, macrófagos, etc) desde la adventicia a la capa muscular e incrementar el grosor de ésta (Stenmark *et al.*, 2018). Además, en la hipoxia crónica hay un incremento de proteínas de matriz extracelular en la adventicia (Gilkes *et al.*, 2013). Todos estos cambios incrementan la capa muscular y adventicia, gatillando un aumento de la resistencia vascular pulmonar (Stenmark *et al.*, 2006; Stenmark *et al.*, 2018; Gao & Raj, 2011, Peñaloza & Arias-Stella, 2007).

Este remodelamiento puede ser dependiente de diversas activaciones, por ejemplo, frente a hipoxia crónica, se describen los factores de transcripción inducibles por hipoxia HIF-1 o HIF-2, los cuales se traslocan al núcleo y se unen al elemento de respuesta a la hipoxia del DNA (HRE), gatillando la síntesis del mRNA de genes relacionados con remodelamiento vascular, entre los muchos genes activados por la hipoxia. En pulmones adultos hipóxicos crónicos, se ha determinado que el factor de transcripción HIF-1 aumenta el remodelamiento vascular pulmonar (Prabhakar & Semenza, 2012). Por lo que planteamos que puede existir una relación entre HIF-1 y la capa muscular y adventicia. De tal manera que un aumento de HIF-1, llevaría a un alza de la expresión proteica de ET-1, TRPC1 y TRPC6, NHE1 y a una reducción de Kv 1.5 y 2.1, llevando a un incremento de la contracción y del remodelamiento de la musculatura lisa, como también lo hace el aumento del pH, por acción del intercambiador sodio-hidrógeno (NHE1) (Prabhakar y Semenza, 2012). No obstante,

no existe información específica, y en el mejor de nuestro conocimiento, si estos mecanismos antes descritos actúan gatillados por HIF en el período neonatal.

Siguiendo este planteamiento, un fármaco relacionado con cinaciguat, YC-1, el cual es un estimulador de la sGC, impide el remodelamiento de células musculares lisas arteriales inducidas por hipoxia, inhibiendo la expresión de HIF-1 α (Huh *et al.*, 2011). Si bien no tenemos mediciones de HIF-1 en esta Tesis, podríamos pensar que cinaciguat podría ejercer un efecto semejante a YC-1, por lo que eventualmente los mecanismos de remodelamiento mencionados anteriormente se podrían ver disminuidos en las APP del cordero recién nacido tratado con cinaciguat.

Otro mecanismo importante del remodelamiento vascular pulmonar podría ser ejercido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales se encuentra aumentadas en la hipoxia crónica (Tabima *et al.*, 2012), estimulando vías de proliferación en células musculares lisas (Li *et al.*, 2016). Además, ROS inactiva el NO produciendo peroxinitritos (Tabima *et al.*, 2012) y posiblemente oxidando al Fe²⁺ de la sGC (Chester *et al.*, 2011; Stasch *et al.*, 2011). Esta enzima se encuentra disminuida en su expresión proteica en grandes alturas (Herrera *et al.*, 2008a) y en su función, estimada por una menor concentración de cGMP en el pulmón del neonato hipóxico crónico en relación con los recién nacidos de nivel de mar (Ferrada *et al.*, 2015). Por estas razones, planteamos la posibilidad que cinaciguat administrado durante 7 días podría haber modificado el estado redox del cordero recién nacido en la altitud, reduciendo los ROS y eventualmente aumentando la cantidad de sGC reducida. Postulamos que un mecanismo que podría aumentar la sGC reducida es el aumento de la expresión de

HO-1, como se describirá más abajo. El hecho es que con cinaciguat hubo una mayor vasodilatación de las APP frente a SNP en relación con los controles, sugiriendo una mayor reducción del hierro a Fe^{3+} , con una mayor función de la sGC. Cabe recordar que SNP es un dador exógeno de NO, que sólo actúa cuando la enzima sGC tiene el Fe^{2+} reducido, por lo que la mayor respuesta de vasodilatación se explicaría por aumento de este último. Otra alternativa es que cinaciguat aumente la expresión proteica de sGC, lo que no ocurrió, ya que la expresión de sGC α 1 y sGC β 1 en el pulmón fue la misma en ambos grupos de corderos recién nacidos.

Un objetivo no planteado en esta Tesis fue determinar la expresión proteica de HO-1 (Anexo B) en los pulmones de los corderos RN, donde HO-1 en el grupo cinaciguat fue significativamente mayor que en el grupo control. Este incremento enzimático podría haber reducido los ROS y la inflamación, por una mayor producción de dos productos de la reacción de la HO-1, biliverdina y bilirrubina, potentes moléculas con importantes características antioxidantes y antiinflamatorias, como lo mencionan diversos autores (Ndisang *et al.*, 2004; Fredenburgh & Perrella, 2009). Semejante a este resultado, Ebensperger, 2011, encontró que animales crónicamente hipóxicos e hipertensos pulmonares de altura tratados con hemina, que tienen en común con cinaciguat, un aumento en la expresión proteica de HO-1, y una mayor relajación frente a SNP que su grupo control. Por lo tanto, el aumento de la expresión proteica de HO-1 en los animales tratados con cinaciguat podría gatillar, entre otras causas desconocidas, la reducción de Fe^{3+} de la sGC a Fe^{2+} , haciendo que la sGC responda de mejor manera al NO, verificado en la miografía frente a SNP. Además, se ha descrito que el aumento de la expresión proteica de HO-1 estimula la generación de CO, la cual estimula la

sGC, generando más vasodilatación. Ejemplo de esto, es que ovejas adultas sometidas a hipoxia aguda, se les indujo una reducción en la RVP al administrar inhalatoriamente CO (Nachar *et al.*, 2001). También, se ha demostrado que existe una mayor producción de CO en los pulmones de neonatos de llama al compararse a neonatos de ovejas, mecanismo que ha permitido a las llamas adaptarse con éxito a la altura evitando una significativa remodelación vascular e hipertensión pulmonar (Herrera *et al.*, 2008b). Otra posible explicación a un menor estado oxidativo celular puede deberse a la generación de grupos tioles (H_2S), como ha sido planteado por Salloum *et al.*, 2012. En estudios de isquemia/reperfusión realizados en cardiomiocitos de ratones, donde utilizaron cinaciguat como tratamiento previo a la injuria, demostraron que aumentó la expresión y transcrito (mRNA) de la proteína cistationina- γ -liasa, enzima responsable de la generación de H_2S . Al aumentar la concentración de este gasotransmisor en los corazones de los ratones tratados con cinaciguat, la presencia de estos grupos tioles permitiría aumentar la formación de enzimas antioxidantes como glutatión, protección mitocondrial y actuar como *scavenger* de ROS. También se ha descrito que PKG puede fosforilar al factor de transcripción Sp1 en sus residuos de serina, aumentando la transcripción de la enzima cistationina- γ -liasa, y por lo tanto, aumentando la generación de H_2S , proceso descrito en células de cáncer de colon humano (Cen *et al.*, 2008). A su vez, la presencia de grupos tioles lleva a un aumento de la localización nuclear del factor de transcripción Nrf2, quien gatilla la activación de genes relacionados a mecanismos antioxidantes, como la expresión de HO-1 (Calvert *et al.*, 2009), resultado evidenciado en esta Tesis. Sin embargo, se desconoce cómo H_2S gatilla la traslocación de Nrf2 al núcleo. Resumiendo, cinaciguat afectaría el estado redox de la célula, eventualmente por

aumento de HO-1, entre otros mecanismos, logrando disminuir el remodelamiento asociado a la hipertensión pulmonar neonatal.

Gran parte de los mecanismos de remodelamiento anteriormente descritos, son consecuencia de una vasoconstricción aumentada, la cual implica altos niveles de Ca^{2+} intracelular a nivel de la célula muscular lisa de las APP. Es por esto que planteamos, que cinaciguat como ha sido descrito en la literatura, actuaría mediante fosforilaciones ejercidas por PKG-1 (Stasch *et al.*, 2011), a pesar de que en esta Tesis no hubo cambios la expresión proteica de PKG-1 al compararse al grupo control, las que llevarían a la disminución del Ca^{2+} intracelular, evitando la vasoconstricción sostenida en el caso de las APP. En corazón, se ha descrito que un aumento del Ca^{2+} intracelular, incrementa el complejo Ca^{2+} -calmodulina, que estimularía la proteína quinasa II, dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaM-kinase II). La CaM-kinase II fosforila la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (Calcium-dependent phosphatase calcineurin), activándola (Molkentin *et al.*, 1994). La fosfatasa calcineurina activada, actúa defosforilando más al factor de transcripción NFAT (Tsai & Kass, 2009), no medido en esta Tesis. El NFAT defosforilado se translocaría al núcleo, donde puede interactuar con otro factor de transcripción GATA4, cuyo resultado es una activación sinérgica de la transcripción de genes asociados a la hipertrofia cardíaca, como como la cadena pesada de miosina tipo alfa (*MyHC α*), la cadena liviana de miosina (*MyLC*) y alfa-actina, etc (Molkentin *et al.*, 1994) y por lo tanto aumentaría el tamaño celular cardíaco (Fiedler *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2000). La menor hipertrofia cardíaca derecha de los corderos tratados con cinaciguat, sugiere que este mecanismo pudo ocurrir en sentido inverso en los corderos tratados con cinaciguat, llevando a una significativa

reducción del peso del corazón derecho en relación al ventrículo izquierdo más septum. Junto con lo anterior, se observó que en los corderos a los cuales se administró cinaciguat, tuvieron mayor sensibilidad frente a sildenafil en miografías de APP, sugiriendo una probable mayor producción de cGMP frente a una activación de la sGC, lo que generaría una inhibición de canales de Ca^{2+} (Schlossman & Desch, 2003), no aumentando la hipertrofia cardíaca derecha e hiperplasia en células vasculares lisas (Prabhakar & Semenza, 2012). Es así como estudios realizados en ratas adultas, cinaciguat previene la hipertrofia cardíaca generada por aumento de la postcarga (Németh *et al.*, 2016). En nuestros corderos tratados con cinaciguat, se verificó una menor hipertrofia derecha (IHCD) y una reducción de las áreas musculares y adventicias en las APP. Por lo que, es probable que el tratamiento con cinaciguat lleve a disminución del Ca^{2+} intracelular y que esto implique una disminución del tamaño celular de los miocitos vasculares por la vía de señalización previamente descrita y por los mecanismos de vasoconstricción, los cuales afectarán el remodelamiento de células musculares lisas y cardíacas.

Por otra parte, en esta Tesis se evidenció el aumento de un mecanismo de vasodilatación *ex vivo*, en miografías de APP utilizando NS1619, un activador de los canales BK_{Ca} , encontrando una mayor función de los BK_{Ca} , sumado a una mayor expresión proteica de BK_{Ca} en los corderos tratados con cinaciguat vs. los controles. Estos efectos no sólo jugarían un rol en la vasodilatación pulmonar (Revermann *et al.*, 2014; Ebensperger *et al.*, 2011), sino que jugarían un rol en explicar la reducción del área muscular lisa de las APP de los corderos tratados con cinaciguat. El mecanismo sería que cinaciguat aumentaría la producción de cGMP, activando a PKG-1, la que a

su vez fosforilaría y activaría los canales BK_{Ca} , gatillando la salida al espacio extracelular de potasio, cloruro y agua, con la consecuente disminución de tamaño celular (Dismuke *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2011). Sin embargo, este mecanismo es especulativo, ya que sólo ha sido descrito, en cultivos celulares de esclerótica corneal de ojo humano, pero en nuestro estudio, podría ocurrir un mecanismo semejante. Así, este último planteamiento se apoya en el resultado de que los animales tratados con cinaciguat tuvieron un mayor número de células por micrómetro cuadrado presentes en la capa muscular de APP en relación con el grupo control (Anexo C), indicando una posible reducción del tamaño celular (objetivo no planteado en esta Tesis). Para determinar con exactitud el tamaño celular en la musculatura en esta tesis, implicaría tener una tinción que delimite la membrana celular o que permita identificar componentes presentes en el citoplasma celular. Esta tinción no la tuvimos en el momento de realización de esta Tesis, pero es una tarea pendiente para llevar a cabo en el futuro. Determinamos conteo celular, homologando un núcleo igual a una célula, considerando que las células musculatura lisas son mononucleadas, sin embargo, puede haber otro tipo de células en la capa muscular que no podemos identificar. Por otra parte, las fotografías de arterias pequeñas pulmonares no permiten una determinación del volumen celular al no ser una técnica de tres dimensiones. Claramente se necesitarán estudios más profundos que busquen explicar de mejor manera los posibles mecanismos que llevan a la disminución de tamaño de las células musculares lisas, pero el tratamiento de cinaciguat demostró que disminuye el área muscular, proceso que se explicaría, entre otras causas, por la disminución del tamaño celular.

Consistente con la menor capa muscular encontrada en APP de este estudio, los resultados de las CCRs de KCl y del análogo de tromboxano (U46619) indican una menor contracción basal en los animales tratados con cinaciguat. Por otra parte, las vasoconstricciones en las CCRs de APP con ET-1 y 5HT se encuentran aumentadas en los animales tratados con cinaciguat, pudiendo ser una respuesta de *feed-back* negativo gatillado por una mayor vasodilatación producida por la importante activación de las vías vasodilatadoras estimuladas por cinaciguat.

La inmunohistoquímica realizada permitiría determinar uno de los posibles mecanismos de reducción de la capa muscular en las APP, que sería una disminución en la proliferación. Sin embargo, el marcador de mitosis Ki67 en corderos tratados con cinaciguat mostró un aumento de los núcleos Ki67 positivos en las APP vs. los controles. Este aumento de la proliferación estaría en conflicto con los mecanismos dependientes del Ca^{2+} intracelular (Schlossmann & Desch, 2011), donde una disminución del Ca intracelular sería incompatible con un aumento de la división celular. Sin embargo, algunos estudios obvian este mecanismo y plantean que la estimulación de la vía NO-cGMP-PKG puede llevar a un aumento en la proliferación celular (Hassid *et al.*, 1994; Wolfsgruber *et al.*, 2003). Es así como el crecimiento de cultivo celular primario de células musculares lisas de aorta de ratas, causado por el factor de crecimiento de fibroblasto 2, esta potenciado por la vía NO-cGMP (Hassid *et al.*, 1994). Lo mismo sucedió en cultivos primarios de células musculares lisas de aorta de ratón al exponerse a 8-Br-cGMP, un análogo de cGMP, y que esta estimulación del crecimiento es mediada por PKG (Wolfsgruber *et al.*, 2003). En este mismo estudio se demostró que ha bajas concentraciones de NO la vía proliferativa se activaba, mientras

que a altas concentraciones de NO la proliferación disminuía. Acorde a este planteamiento, en esta Tesis se demostró que la expresión proteica de eNOS se encuentra disminuida, mecanismo explicado por un *feedback* negativo por aumento de cGMP (Vaziri & Wang, 1999), lo que eventualmente llevaría a menores concentraciones de NO y activación de la vía proliferativa en las APP, medido como células Ki67 positivas vs controles. A su vez, también existe la posibilidad de que a pesar de que se disminuyó el grosor de la capa muscular lisa y adventicia, la noxa primordial de la hipertensión pulmonar en estos animales de grandes alturas como lo es la hipoxia hipobárica (Rudolph, 1979), aún se mantiene, y por lo tanto los mecanismos de proliferación aún se mantendrían activados en las APP de ambos grupos, pero en el grupo tratado con cinaciguat que tiene aumentados los mecanismos vasodilatadores (mayor función frente a SNP y NS1619), aumentaría la proliferación de sus células musculares lisas como mecanismo compensatorio, y así podría mantener un tono vascular equilibrado.

Si bien, no hemos encontrado información sobre disminución de mecanismos de apoptosis producido por cinaciguat en células musculares lisas, planteamos que diversos estudios realizados con cinaciguat, han demostrado que inhibe la apoptosis en tejido cardíaco ya sea medido como marcadores como TUNEL o Bcl2 (Salloum *et al.*, 2012; Németh *et al.*, 2016; Ruppert *et al.*, 2019). Una proyección de esta Tesis a futuros nuevos estudios sería describir la presencia de mecanismos apoptóticos a nivel de corazón (V-anexina, caspasas varias, Bax/Bcl2, citocromo C, Smac/Diablo, entre otros), para corroborar los posibles mecanismos que explicarían la disminución de la capa muscular y del ventrículo derecho, fuera de los ya descritos (hipoplasia y

proliferación), no olvidando utilizar marcadores de necrosis o autofagia, otros posibles mecanismos que pueden explicar de mejor manera los resultados obtenidos.

En resumen, cinaciguat aumentaría la producción de cGMP, mediado por una mayor una mayor función de sGC (indirectamente determinado por mayor sensibilidad frente a sildenafil), activando a PKG-1 (indirectamente determinado por la mayor relajación frente a NS1619). PKG-1 regularía diversas vías relacionadas con hipertrofia, disminuyendo su acción, evidenciados en el índice de hipertrofia cardiaca derecha (IHCD) menor en los animales tratados con cinaciguat. Además, de una menor IHCD, componente clave en la hipertensión pulmonar, puede ser consecuencia de una menor postcarga por la reducida RVP en el grupo cinaciguat. Más aún, la menor RVP al final del tratamiento con cinaciguat, se relaciona con la menor capa muscular y adventicia en las arterias pequeñas de resistencia. Como la densidad de células en la capa muscular es mayor en los animales tratados con cinaciguat, la menor capa muscular podría ser por un menor tamaño de las células musculares de las APP. Por otra parte, la menor contracción con KCL y U46619 es consistente con la menor capa muscular y adventicia en APP, y estos resultados concuerdan con la notable disminución en la RVP observadas en los experimentos *in vivo* crónico y durante el episodio de hipoxia aguda sobreimpuesta. El aumento de proliferación en APP es probable que sea por una menor producción de NO, verificado indirectamente por la menor expresión de eNOS en los animales tratados con cinaciguat o por la mantención de la noxa (hipoxia hipobárica). Finalmente, el tratamiento con cinaciguat afecta ciertas proteínas involucradas en mecanismos de vasodilatación pulmonar como fueron la mayor expresión y función de BK_{Ca} y la mayor expresión de HO-1, todo esto se debería a un

aumento del cGMP, indirectamente determinado por la mayor sensibilidad en una CCR frente sildenafil.

Considerando los resultados obtenidos, cinaciguat podría eventualmente ser usado agudamente en las crisis hipertensivas que tienen lugar en la evolución de la hipertensión arterial de recién nacido, ya en tratamiento con NO inhalatorio. Mas aún, en el tratamiento crónico, cinaciguat podría jugar un rol en reducir el remodelamiento vascular pulmonar y la hipertrofia ventricular derecha, fenómenos patológicos muy difíciles de revertir, en conjunto con un vasodilatador, como fasudil, sildenafil u óxido nítrico. Sin embargo, más estudios son necesarios para considerar a cinaciguat un fármaco con potencial uso para tratar la hipertensión pulmonar del recién nacido.



8. Bibliografía

1. Abman SH, Hansmann G, Archer SL, Ivy DD, Adatia I, Chung WK, Hanna BD, Rosenzweig EB, Raj JU, Cornfield D, Stenmark KR, Steinhorn R, Thébaud B, Fineman JR, Kuehne T, Feinstein JA, Friedberg MK, Earing M, Barst RJ, Keller RL, Kinsella JP, Mullen M, Deterding R, Kulik T, Mallory G, Humpl T, Wessel DL. 2015. Pediatric Pulmonary Hypertension: Guidelines From the American Heart Association and American Thoracic Society. *Circulation*; 132:2037-2099.
2. Abman SH. 1999. Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Rev*; 20:e103-e109.
3. Astorga CR, González-Candia A, Candia AA, Figueroa EG, Cañas D, Ebensperger G, Reyes RV, Llanos AJ, Herrera EA. 2018. Melatonin Decreases Pulmonary Vascular Remodeling and Oxygen Sensitivity in Pulmonary Hypertensive Newborn Lambs. *Front Physiol.*; 9:185.
4. Barrington KJ, Finer N, Pennaforte T. 2017. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.*; 1:1-63.
5. Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. 2000. Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci*; 97:2928-2933.

6. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ. 2009. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res.*;105(4):365-374.

7. Castillo-Galán S, Quezada S, Moraga FA, Ebensperger G, Herrera EA, Beñaldo F, Hernandez I, Ebensperger R, Ramirez S, Llanos AJ, Reyes RV. 2016. 2-aminoethyldiphenylborinate modifies the pulmonary circulation in pulmonary hypertensive newborn lambs with partial gestation at high altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 311:L788-L799.

8. Cen B, Deguchi A, Weinstein IB. 2008. Activation of protein kinase G increases the expression of p21CIP1, p27KIP1, and histidine triad protein 1 through Sp1. *Cancer Res* 68: 5355-5362.

9. Chang FJ, Lemme S, Sun Q, Sunahara RK, Beuve A. 2005. Nitric oxide-dependent allosteric inhibitory role of a second nucleotide binding site in soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem.*; 280:11513-11519.

10. Chester M.; Tourneux P, Grover TR, Gien J, Abman SH. 2009. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, causes potent and sustained pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 297:L318-L325.

11. Chester MA, Seedor M, Tourneux P, Gien J, Tseng N, Grover T, Wright J, Stasch JP, Abman SH. 2011. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, augments

cGMP after oxidative stress and causes pulmonary vasodilation in neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol.*; 301: L755-L764.

12. Craigmill, AL, Holland RE, Robinson D, Wetzlich S, Arndt T. 2000. Serum pharmacokinetics of oxytetracycline in sheep and calves and tissue residues in sheep following a single intramuscular injection of a long-acting preparation. *J Vet Pharmacol Therap.*; 23:345-352.

13. Dampney RA. 2016. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ.*; 40(3):283-296.

14. Dismuke WM, Sharif NA, Ellis DZ. 2009. Human trabecular meshwork cell volume decrease by NO-independent soluble guanylate cyclase activators YC-1 and BAY-58-2667 involves the BKCa ion channel. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 50(7):3353-3359.

15. Duarte J, Espinosa RF, Díaz S, Sánchez G, Lee Eng VC, Mijangos J, Barragan JA. 2008. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Med Int Mex.*; 24:397-406.

16. Ebersperger G. 2011. Rol del sistema hemoxigenasa-monóxido de carbon 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, Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, 139p.

17. Ellis DZ. 2011. Guanylate cyclase activators, cell volume changes and IOP reduction. *Cell Physiol Biochem.*; 28(6):1145-1154.

18. Escribano S, Barbera JA, Suberviola V. 2010. Current diagnostic and prognostic assessment of pulmonary hipertensión. *Rev Esp Cardiol May.*; 63:583-596.

19. Evgenov OV, Kohane DS, Bloch KD, Stasch JP, Volpato GP, Bellas E, Evgenov NV, Buys ES, Gnoth MJ, Graveline AR, Liu R, Hess DR, Langer R, Zapol WM. 2007. Inhaled agonists of soluble guanylate cyclase induce selective pulmonary vasodilation. *Am J Respir Care Med.*; 176(11):1138-1145.

20. Ferrada J, Ebensperger R, Cerda T, Catriman D, Araya C, Beñaldo F, Díaz, Marcela M, Fernando M, Castillo S, Herrera E, Reyes V, Llanos A, Ebensperger G. 2015. Differential regulation of NO pathway in pulmonary circulation of neonatal sheep from low and high altitudes. XXX Reunión anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, 22–25 de septiembre, Coquimbo, Chile.

21. Ferrada J. 2017. Estudio de la reactividad vascular pulmonar mediada por guanosil mono fosfato cíclico en neonatos de oveja tratados con hemina. Memoria para optar al grado de Bioquímico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 69p.

22. Fiedler B, Lohman SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. 2002. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy

signalling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci.*; 99:11363-2683.

23. Fredenburgh LE, Ma J, Perella MA. 2009. Cyclooxygenase-2 inhibition and hypoxia-induced pulmonary hypertension: effects on pulmonary vascular remodelling and contractility. *Trends Cardiovasc Med.*; 19:31-37.

24. Frey R, Mück W, Unger S, Artmeier-Brandt U, Weimann G, Wensing G. 2008. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat (BAY 58-2667) in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol.*; 48(12):1400-1410.

25. Gao Y, Raj U. 2010. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and the newborn. *Physiol Rev.*; 90:12191-1335.

26. Gao Y, Raj U. 2011. Hypoxic pulmonary hypertension of the newborn. *Compr Physiol.*; 1:61-79.

27. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. 2013. Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem.*; 288:10819-10829.

28. Glantz SA, Slinker BK. 2001. Repeated Measures In Primer of Applied Regression and Analysis of variance (2nd ed.). McGraw-Hill, Inc. New York.

29. Glantz SA. 1981. In Primer of Biostatistics, McGraw-Hill Book Company, New York.

30. Guglani L, Lakshminrusimha S, Ryan RM. 2008. Transient tachypnea of the newborn. *Pediatr Rev.*; 29(11):e59-e65.

31. Guyton AC, Hall JE. 2016. Tratado de Fisiología Médica. 13ª Edición. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid; 2924p.

32. Hamdani N, Paulus WJ. 2013. Myocardial titin and collagen in cardiac diastolic dysfunction: partners in crime. *Circulation*; 128(1):5-8.

33. Hassid A, Arabshahi H, Bourcier T, Dhaunsi GS, Matthews C. 1994. Nitric oxide selectively amplifies FGF-2-induced mitogenesis in primary rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol.*; 267:H1040-1048.

34. Hernández-Díaz S, Van Marter LJ, Werler MM, Louik C, Mitchell AA. 2007. Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics.*; 120:e272-e282.

35. Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, Sanhueza EM, Reyes VR, Ebensperger G, Parer JT, Valdez EA, Giussani DA, Blanco CE, Hanson MA, Llanos AJ. 2007 High

altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 292:R2234–R2240.

36. Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, Casanello P, Mendez N, Ebensperger R, Sepulveda-Katan E, Pulgar VM, Cabello G, Blanco CE, Hanson MA, Parer JT, Llanos AJ. 2008a. Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc Res.*; 77:197-201.

37. Herrera EA.; Ebensperger G, Krause BJ, Riquelme RA, Reyes RV, Capetillo M, Gonzalez S, Parer JT, Llanos AJ. 2008b. Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep. *Pediatr Res.*; 63:169-175.

38. Herrera EA, Riquelme RA, Ebensperger G, Reyes RV, Ulloa CE, Cabello G, Krause BJ, Parer JT, Giussani DA, Llanos AJ. 2010a. Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 299(6):R1676-R1684.

39. Herrera EA, Verkerk MM, Derks JB, Giussani DA. 2010b. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. *Plos One*; 5(2):e9250.

40. Herrera EA, Rojas RT, Krause BJ, Ebensperger G, Reyes RV, Giussani DA, Parer JT, Llanos AJ. 2016. Cardiovascular function in term fetal sheep conceived, gestated and studied in the hypobaric hypoxia of the Andean altiplano. *J Physiol.*; 594:1231-1245.

41. Herrera S, Gabrielli L, Paredes A, Saavedra R, Ocaranza M, Sepúlveda P, Donoso H, López L, Verdejo H, Baraona F, Castro P. 2016. Sobrevida a mediano plazo en los pacientes con hipertensión arterial pulmonar en la era de terapias vasodilatadoras específicas del territorio vascular pulmonar. *Revista médica de Chile*, 144(7), 829-836.

42. Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee YS. 2011. YC-1 Attenuates Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice. *Pulm Pharmacol Ther.*; 24:638-46.

43. Ivy D. 2016. Pulmonary hypertension in children. *Cardiol Clin.*; 34(3): 451-472.

44. Kato T, Sano M, Miyoshi S, Sato T, Hakuno D, Ishida H, Kinoshita-Nakasawa H, Fukuda K, Ogawa S. 2000. Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res.*; 87:937-945.

45. Keyes LE, Armaza JF, Niermeyer S, Vargas E, Young DA, Moore LG. 2003. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res.*; 54:20-25.

46. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JK. 2012. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca²⁺ signalling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 302:H1546–H1562.

47. Lakshminrusimha S, Keszler M. 2015. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neoreviews*; 16(12):e680-e692.

48. Li Q, Mao M, Qiu Y, Liu G, Sheng T, Yu X, Wang S, Zhu D. 2016. Key Role of ROS in the process of 15-Lipoxygenase/15-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced pulmonary vascular remodeling in hypoxia pulmonary hypertension. *PLoS ONE*;11:e0149164.

49. Lopez NC, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes RV, Calaf G, Cabello G, Moraga FA, Benaldo FA, Diaz M, Parer JT, Llanos AJ. 2016. Role of the RhoA/ROCK pathway in high-altitude associated neonatal pulmonary hypertension in lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 310:R1053-R1063.

50. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. 2015. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery.*; 14:623-641.

51. Mátyás C, Németh BT, Oláh A, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Kökény G, Horváth EM, Szabó G, Merkely B, Radovits T. 2015. The soluble guanylate cyclase activator cinaciguat prevents cardiac dysfunction in a rat model of type-1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.*; 14:145.

52. MINSAL. 2011. Síndrome de Dificultad Respiratoria en el recién nacido. <en línea>
<<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7222754637f78646e04001011f014e64.pdf>>
[consulta: 25-02-2017].

53. Mulvany MJ, Halpern W. 1977. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.*; 41(1):19-26.

54. Molkenin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE (1994). Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol.* 14:4947–4957.

55. Nachar RA, Pastene CM, Herrera EA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Troncoso S, Llanos AJ. 2001. Low-dose inhaled carbon monoxide reduces pulmonary vascular resistance during acute hypoxemia in adult sheep. *High Alt Med Biol.*;2(3):377-385.

56. Ndisang JF, Tabien HEN, Wang R. 2004. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens.*; 22:1057-1074.

57. Németh BT, Mátyás C, Oláh A, Lux Á, Hidi L, Ruppert M, Kellermayer D, Kökény G, Szabó G, Merkely B, Radovits T. 2016. Cinaciguat prevents the development of pathologic hypertrophy in a rat model of left ventricular pressure overload. *Sci Rep.*; 6:37166.

58. Neubig RR. 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.*; 55(4):597-606.

59. Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV. 1986. The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquor reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol.*; 376:321-340.

60. Orlov SN1, Dam TV, Tremblay J, Hamet P. 1996. Apoptosis in vascular smooth muscle cells: role of cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Commun.*; 25;221(3):708-715.

61. Parrau D, Ebersperger G, Herrera EA, Moraga F, Riquelme RA, Ullo CE, Rojas RT, Silva P, Hernandez I, Ferrada J, Diaz M, Parer JT, Cabello G, Llanos AJ, Reyes RV. 2013. Store-operated channels in the pulmonary circulation of high- and low-altitude neonatal lambs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 304:L540-L548.

62. Peñaloza D, Arias-Stella J. 2007. The heart and pulmonary circulation at high altitudes. Healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation*; 115:1132-1146.

63. Pernow J, Jung C. 2013. Arginase as potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovascular Research.*; 98:334-343.

64. Porter JP. 2000. Contribution of central ANG II to acute stress-induced changes in baroreflex function in young rats. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol.*; 279(4):1386-1391.

65. Prabhakar NR, Semenza GL. 2012. Adaptive and Maladaptive Cardiorespiratory Responses to Continuous and Intermittent Hypoxia Mediated by Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2. *Physiol Rev.*; 92:967-1003.

66. Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheijm CA, Marcus JT, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS. 2013. Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*; 128(18):2016-2025.

67. Rallis D, Deierl A, Atreja G, Chaban B, Banerjee J. 2018. The efficacy of inhaled nitric oxide treatment in premature infants with acute pulmonary hypertension. *Early Human Dev.*; 127:1-5.

68. Reinke Y, Gross S, Eckerle LG, Hertrich I, Busch M, Busch R, Riad A, Rauch BH, Stasch JP, Dörr M, Felix SB. 2015. The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat and the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat exert no direct effects on contractility and relaxation of cardiac myocytes from normal rats. *Eur J Pharmacol.*; 767:1-9.

69. Revermann M, Neofitidou S, Kirschning T, Schloss M, Brandes RP, Hofstetter C. 2014. Inhalation of the BK(Ca)-opener NS1619 attenuates right ventricular pressure and improves oxygenation in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. *PLoS One.*; 9(1):e86636.

70. Rudolph A. 1979. Fetal and Neonatal Pulmonary Circulation *Ann. Rev. Physiol.*; 41:383-395.

71. Ruppert M, Korkmaz-Icöz S, Li S, Brlecic P, Németh BT, Oláh A, Horváth EM, Veres G, Pleger S, Grabe N, Merkely B, Karck M, Radovits T, Szabó G. 2019. Comparison of the reverse-remodeling effect of pharmacological soluble guanylate cyclase activation with pressure unloading in pathological myocardial left ventricular hypertrophy. *Front Physiol.*; 9:1869.

72. Salloum FN, Das A, Samidurai A, Hoke NN, Chau VQ, Ockaili RA, Stasch JP, Kukreja RC. 2012. Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 302(6):H1347-H1354.

73. Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. 2003. *Ann Med.*; 35:21-27.



74. Schlossmann J, Desch M. 2011. IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 301(3):H672-682.

75. Stasch JP, Pacher P, Evgenov OV. 2011. Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. *Circulation.*; 123:2263-2273.

76. Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija c, Apelier H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroeder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. 2002. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol.*; 136:773-783.

77. Steinhorn RH. 2010. Neonatal pulmonary hypertension. *Pediatric Crit Care Med.*; 11(2):s79-s84.

78. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. 2006. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Cellular and Molecular Mechanisms. *Circ Res.*; 99:675-691.

79. Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, Tudor RM. 2018. Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research*; 114:551-564.

80. Tabima DM, Frizzell SF, Gladwin MT. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. 2012. *Free Radic Biol Med.*; 52:1970-1986.

81. Torres F, Gonzalez-Candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Seron-Ferre M, Reyes RV, Llanos AJ, Herrera EA. 2015. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res.*; 58:362-373.

82. Tsai EJ, Kass DA. 2009. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther.*;122(3):216-38.

83. Vaziri ND, Wang XQ. 1999. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*; 34:1237-1241.

84. Walsh-Sukys M, Tyson J, Wright LL, Bauer C, Korones S, Stevenson D, Verter J, Stoll B, Lemons J, Papile L, Shankaran S, Donovan E, Ehrenkranz R, Fanaroff A. 2000. Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn in the Era Before Nitric Oxide: Practice Variation and Outcomes. *Pediatrics.*; 105:14-20.

85. Whauthy P, Pagnamenta A, Vassalli F, Naeije R, Brimiouille S. 2004. Right ventricular adaptation to pulmonary hypertension: an interspecies comparison. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 286:H1441-H1447.

86. Wolfsgruber W, Feil S, Brummer S, Kuppinger O, Hofmann F, Feil R. 2003. A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci.*; 100(23):13519-13524.

87. Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ, Haystead TA. 2004. Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.*; 279(33):34496-34504.



9. Anexos

A. Certificación del Comité de Bioética Animal (# 0643), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.



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

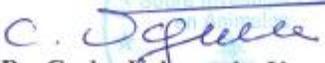
CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“After years of “NO” treatment, we seek for YES treatments: soluble and particulate Guanylyl Cyclases could say YES to treat pulmonary arterial hypertension of the newborn”* cuyo investigador responsable es el **Dr. Jorge Anibal Llanos Mansilla** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (**Protocolo CBA# 0643 FMUCH**).

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

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2014.

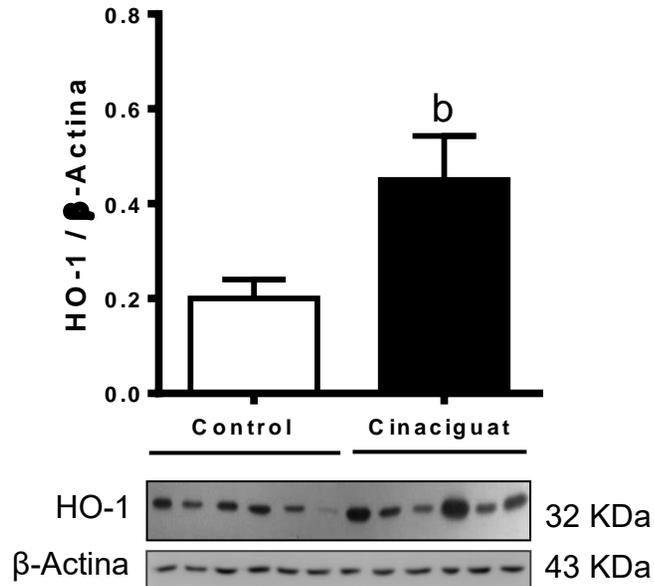
El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO”(www.med.uchile.cl/normas/indice.html) después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 01 de Octubre de 2013



B.



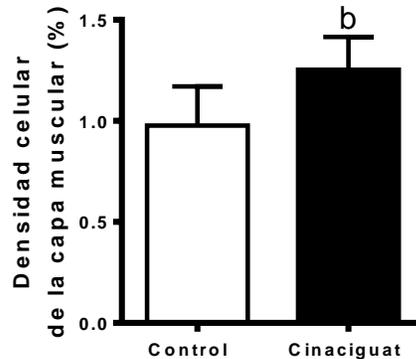
Expresión proteica de HO-1 en tejido pulmonar. Barras blancas = grupo control, barras negras = grupo cinaciguat. b vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$

Proteína	Cantidad proteína [μg]	Dilución anticuerpo	Fabricante	N° catálogo
HO-1	8	1:1000	Fitzgerald	10R-H112A

La preparación de la proteína fue desarrollada según técnicas usadas previamente en el laboratorio (Ebensperger et al., 2005). El blot fue previamente incubado con anticuerpo primario anti-HO-1 (monoclonal, Fitzgerald), seguido por una incubación

con anticonejo IgG conjugado con peroxidasa o anticuerpo secundario antiratón IgG (ambos provenientes de Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). La señal fue detectada por quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher scientific, Rockford, IL, USA) y autoradiografía. Las bandas obtenidas por inmunoblot fueron cuantificadas por análisis de densitometría usando un software de imágenes (Scion Image Beta 4.02 Win; Scion Corporation, MD, USA).

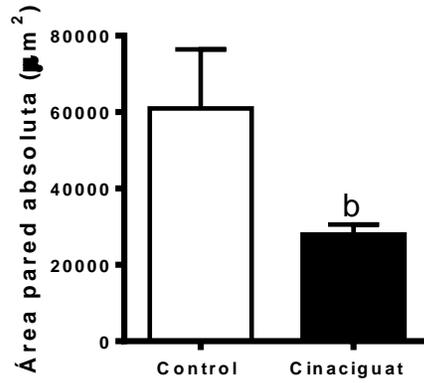
C.



Densidad celular del área de la capa muscular por micrómetro cuadrado (%) en arterias pequeñas pulmonares. Barras blancas = grupo control, barras negras = grupo cinaciguat. b vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

Para calcular la densidad celular del área de la capa muscular por micrómetro cuadrado $[(\text{celulas}/\mu\text{m}^2) \times 100]$, los núcleos de las células fueron contados en el área delimitada entre la lámina elástica externa e interna, y el promedio de cada arteria pequeña pulmonar fue dividido por el área total medida anteriormente.

D.



Área pared absoluta (μm^2) en arterias pequeñas pulmonares. Barras blancas = grupo control, barras negras = grupo cinaciguat. b vs. grupo control, test no paramétrico de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

Para calcular el área de pared absoluta en micrómetro cuadrado, al área delimitada por el límite externo de la adventicia se resto el área delimitada por la lámina elástica interna (área del lumen interno).