

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



**EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIPURINÉRGICO ESPECÍFICO PARA EL RECEPTOR  $P_2Y_{14}$  EN LA  
FUNCIÓN CARDIORESPIRATORIA Y SOBREVIVENCIA EN UN MODELO DE RATAS CON HIPERTENSIÓN  
ARTERIAL PULMONAR**

**CRISTIAN ARY ORELLANA LÓPEZ**

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

Director de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Henríquez L.

**2021**

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

**INFORME DE APROBACION 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

**CRISTIAN ARY ORELLANA LÓPEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Fisiología** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de septiembre de 2021.

**Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna**  
Director de Tesis.

**Programa de Fisiología, ICBM Programa de Fisiopatología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

Prof. Dr. Germán Ebensperger

Prof. Dr. Enrique Jaimovich

Prof. Dr. Rodolfo Miralles

Prof. Dr. Julia Guerrero  
Presidenta Comisión

A mi padres  
que sacrificaron su propio bienestar  
en favor de sus hijos.

A mis hermanos  
que me han brindado apoyo  
en momentos difíciles.

A mi profesor  
que con humildad me entregó  
seguridad en cada uno de mis pasos  
durante mi formación.

Durante la realización de esta investigación  
las personas del país salieron a las calles para  
reclamar equidad social.  
Posteriormente, una pandemia afectó  
a todos los países del globo.  
La presente investigación va a quienes partieron  
en estos procesos.

## **Agradecimientos**

Agradecimientos al Dr. Mauricio Henríquez quien con cercanía y humildad nos forma con una mirada crítica en lo científico y social. Gracias por entregarme la seguridad que yo no poseo.

Agradecer a cada persona que forma parte del Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar: Marcelo Fonseca, Dra. Carol San Martín, Francisca Varas, Dra. Andrea Méndez, Aline López y Angie Rivas, quienes desde mi llegada me brindaron compañía, enseñanzas académicas y visiones de vida. Gracias por el tiempo dedicado en cada paso de esta investigación que sin ustedes, no hubiese sido posible.

A la Dra. Julia Guerrero, Dr. Enrique Jaimovich, Dr. Rodolfo Miralles y Dr. Germán Ebensperger, quienes entregaron su tiempo a la lectura y corrección de la presente investigación. Gracias a cada uno por sus aportes, que fueron imprescindibles para llegar al final del proceso formativo.

A mis amigos que con su cariño y sus gestos, me permitieron llegar hasta el final. Agradecer a la familia y a la música, que siempre me han acompañado.

## 1. ÍNDICE DE AVREVIATURAS

ERS	European Respiratory Society
ESC	European Society of Cardiology
RVP	Resistencia vascular pulmonar
PECP	Presión de enclavamiento capilar pulmonar
GTP	Guanosin trifosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
HAP	Hipertensión Pulmonar
MCT	Monocrotalina
PAPm	Presión Arterial Pulmonar media.
PPTN	Ácido piperidinilfenilo trifluorometilfenilo napftónico
VO <sub>2máx</sub>	Capacidad máxima de Oxígeno
UDP-Glc	Uridin Difosfato – Glucosa
SIVd	Septum interventricular en diástole.
DVIId	Diámetro ventrículo izquierdo en diástole.
PPVId	Pared posterior ventrículo izquierdo en diástole.
DVIIs	Diámetro ventrículo izquierdo en sístole.
FE	Fracción de eyección.
FA	Fracción de acortamiento.
GC	Gasto Cardiaco.
HR	Frecuencia Cardiaca.
E	Llenado rápido.
A	Contracción auricular.
E/A	Relación Llenado Contracción.
Vmax	Velocidad máxima.
Vmed	Velocidad media.
máxG	Gradiente máxima.
meanP	Gradiente media.
VTI	Integral velocidad tiempo.
TAcAP	Tiempo de aceleración arteria pulmonar.
VIP	Venas Intrapulmonares pequeñas.
MLCP	Fosfatasa de la cadena liviana de miosina

AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
PKA	Proteína Kinasa A
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
VIP	Venas intrapulmonares pequeñas.
PI3K-γ	Fosfoinositol 3-quinasa
GPCRK2	Receptor kinasa 2 acoplado a proteínas G
GPCRK3	Receptor kinasa 3 acoplado a proteínas G
PLC	Fosfolipasa C
MAPK	Proteínas Kinasas activadas por Mitógeno
NE	Neutrófilo Elastasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
VD/PC	Ventrículo derecho / Peso Corporal

## 2. ÍNDICE

1 Índice y Abreviaturas .....	4
2. Índice .....	6
3. Resumen .....	7
4. Abstract .....	8
5. Introducción .....	9
5.1. Generalidades sobre Hipertensión Pulmonar .....	9
5.2. Ecocardiografía en Hipertensión Pulmonar .....	10
5.3. Inflamación en Hipertensión Pulmonar .....	14
5.4. Receptores Metabotrópicos .....	15
5.5. Señalización Purinérgica .....	15
5.6. Receptores metabotrópicos purinérgicos P <sub>2</sub> Y .....	16
5.7. Actividad del Receptor P <sub>2</sub> Y <sub>14</sub> .....	16
5.8. Papel del Receptor P <sub>2</sub> Y <sub>14</sub> en procesos fisiopatológicos.....	18
5.9. Hipertensión Arterial Pulmonar y capacidad cardiorrespiratoria.....	19
5.10. Modelo Animal de HAP inducido por Monocrotalina.....	19
6. Hipótesis.....	21
7. Objetivos	
7.1 General.....	21
7.2 General específicos.....	21
8. Materiales y Métodos.	
8.1 Tipo de estudio .....	22
8.2 Calculo de tamaño muestral .....	22
8.3 Animales .....	22
8.4 Procedimientos .....	23
8.5 Modelo de hipertensión en ratas con monocrotalina .....	23
8.6 Evaluación Ecocardiográfica .....	23
8.7 Capacidad Cardiorrespiratoria.....	24
8.8 Instilación Intratraqueal .....	25
8.9 Escala Morton & Griffiths .....	25
8.10 Eutanasia.....	26
8.11 Índice de Fulton .....	26
8.12 Análisis estadístico .....	26
9. Resultados.....	27
9.1 Índice de Fulton .....	27
9.2 Ecocardiografía .....	28
9.3 Ingesta y Peso.....	31
9.4 Capacidad Cardiorrespiratoria.....	33
9.5 Sobrevida .....	35
10. Discusión .....	37
11. Conclusiones .....	46
12. Referencias .....	47

### 3. RESUMEN

La HAP es una enfermedad crónica, progresiva y mortal, presenta síntomas inespecíficos lo que lleva a un retraso en el diagnóstico y en la terapia óptima. La HAP idiopática se caracteriza por un proceso inflamatorio que genera obstrucción y obliteración de la luz vascular pulmonar, generando aumento en la resistencia vascular pulmonar y como consecuencia, se genera hipertrofia, dilatación del ventrículo derecho, produciendo pérdida de la capacidad cardiorrespiratoria y bajas tasas de supervivencia.

La activación del receptor purinérgico  $P_2Y_{14}$  es un factor importante para inducir la expresión de genes inflamatorios, el reclutamiento de neutrófilos y la remodelación vascular. Los tratamientos actuales de HAP no se dirigen específicamente a la causa de la HAP como son el remodelado vascular y la inflamación. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento antipurinérgico específico para el receptor  $P_2Y_{14}$  sobre la función cardiorrespiratoria en un modelo de rata con Hipertensión Arterial Pulmonar. Se utilizaron tres grupos de animales, un grupo de ratas sanas, un grupo de ratas HAP y un grupo de ratas HAP tratadas con PPTN (un inhibidor específico del receptor  $P_2Y_{14}$ ). Comparamos la masa del VD, las variables ecocardiográficas, la capacidad cardiorrespiratoria y la sobrevivencia. Nuestros resultados indican que la variable ecocardiográfica TacAP, disminuyó significativamente a la cuarta semana en animales HAP pero no en animales HAP tratados con PPTN. Por otro lado, la capacidad cardiorrespiratoria disminuyó a la cuarta semana en la prueba con animales HAP y HAP+PPTN. La sobrevivencia de las ratas con HAP y HAP+PPTN fue menor a las ratas control, y también se observó un aumento significativo en la masa de VD en ratas HAP y HAP+PPTN.

Concluimos que el tratamiento con PPTN logró un atraso en la progresión de la HAP en ratas, sin embargo PPTN no mejoró la función cardiorespiratoria ni la sobrevivencia en un modelo de ratas con HAP. Sugerimos explorar otra forma de administración y también otras dosis de PPTN para determinar el impacto de los parámetros inflamatorios de las ratas.

#### 4. ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic cardiopulmonary, progressive and mortal disease. PAH is presented with unspecific symptoms which leads to a delay in diagnosis and optimal therapy.

Idiopathic PAH is characterized by an inflammatory process that generates obstruction and obliteration of the pulmonary vascular lumen, generating an increase in pulmonary vascular resistance, as consequence, right ventricle (RV) hypertrophy and dilation is generated, producing loss of cardiorespiratory capacity and low survival rates.

The activation of the  $P_2Y_{14}$  purinergic receptor is an important factor to induce expression of inflammatory genes, recruitment of neutrophils and vascular remodeling. Current PAH treatments are not specifically target to the cause of the PAH, such as vascular remodeling and inflammation. For that reason, the objective of this study was to evaluate the effect of specific antipurinergic treatment for the  $P_2Y_{14}$  receptor on cardiorespiratory function in a PAH rat model. Three groups of animals was used, a group of healthy rats, a group of PAH rats and a group of PAH rats treated with PPTN (an specific  $P_2Y_{14}$  receptor inhibitor), to evaluate the cardiorespiratory function. We compared RV mass, echocardiographic variables, cardiorespiratory capacity and survival. Our results indicate that the echocardiographic variable pulmonary artery aceleration time (PAAT) diminished significantly at the fourth week in PAH animals, but not in PAH+PPTN group. On the other hand, the cardiorespiratory capacity decreased we at the fourth week in the PAH and PAH+PPTN animals test. The survival in PAH and PAH+PPTN rats was lower than control rats and also a significant increase in RV mass in PAH and PAH+PPTN rats was observed

We concluded that the PPTN treatment achieved a delay in the PAH progression in rats. However, PPTN did not improve cardiorespiratory function or survival in a PAH rat model. We suggest to explore another way of administration and also other dosis of the PPTN to determine the inflammatory parameters impact of the rats.

## 5. INTRODUCCIÓN

### 5.1 Generalidades sobre Hipertensión Pulmonar

Según la ESC y ERS, definieron el 2015 la HAP como un aumento de la PAPm  $\geq 25$  mmHg [Weinberger et al. 2014, Galié et al. 2015, Churg et al. 2017] con un límite superior de normalidad de 20 mmHg, medido por cateterismo cardiaco derecho [Galié et al. 2015, Simonneau et al. 2019], sin embargo, el Sexto Simposio Mundial sobre Hipertensión Pulmonar el 2018 consideró el alto riesgo de mortalidad de pacientes con PAPm entre 21-24 mmHg, por tanto definió la HAP como un aumento de la PAPm  $\geq 20$  mmHg medido por cateterismo cardiaco derecho pero además considera la resistencia vascular pulmonar (RVP) y la presión de enclavamiento capilar pulmonar (PECP) para especificar la definición de HAP, como lo demuestra la tabla 1 [Simonneau et al. 2019, Greifswald et al. 2020, Yaghi et al. 2020].

Definición	PAPm (mmHg)	RVP (mmHg)	PECP (Wood Units)
HP Precapilar Aislada	20	<15	3
HP Precapilar y Postcapilar combinada.		15	3
HP Postcapilar aislada.		15	<3

**Tabla 1:** Definiciones hemodinámicas de la Hipertensión Pulmonar Arterial. (Yaghi et al. 2020)

Varios mecanismos estarían involucrados en la etiología de la HAP como cambios intimaes y mediales arteriales, que conducen al engrosamiento de paredes y estrechamiento u obliteración de la luz vascular, considerado un factor potencial de HAP. También se ha considerado como causantes a la vasoconstricción en respuesta a la hipoxia y al aumento crónico del flujo sanguíneo a través del lecho vascular pulmonar generado por derivaciones intracardiacas congénitas de izquierda a derecha [Weinberger et al. 2014].

Los tratamientos actuales de HAP no se dirigen específicamente a la causa de la enfermedad como son el remodelado vascular y la inflamación, por tanto existe una necesidad urgente de identificar mejor los mecanismos patobiológicos subyacentes al estrechamiento progresivo de la luz arterial pulmonar [Ryan et al. 2015]. El hallazgo de los mecanismos involucrados en la etiología de la HAP, están ligados íntimamente al diagnóstico oportuno de la enfermedad, donde el cateterismo cardiaco derecho cumple un rol clave, sin embargo se ha reportado que

también variables ecocardiográficas son útiles para determinar la presencia y progreso de la enfermedad de una forma confiable y menos invasiva para los pacientes.

## **5.2 Ecocardiografía en Hipertensión Pulmonar.**

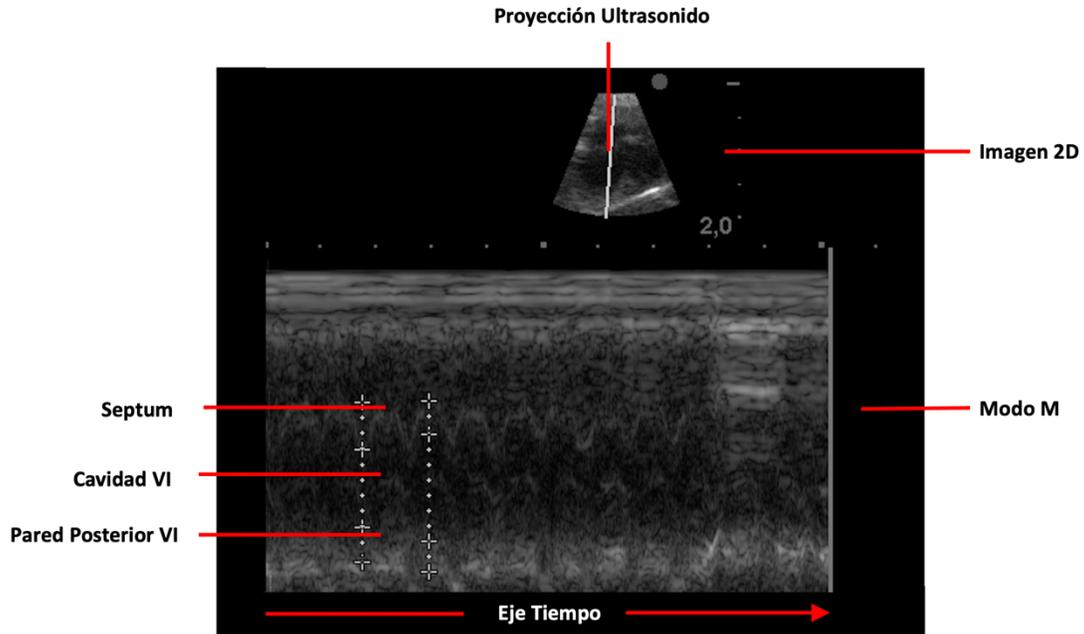
La ecocardiografía es un procedimiento de imagen que permite evaluar las funciones cardíacas y sirve como un importante predictor de supervivencia en pacientes HAP [Zhu et al. 2019]. A medida que los síntomas empeoran, el ventrículo derecho aumenta de tamaño en respuesta a la sobrecarga de volumen y presión en proporción al aumento de la resistencia vascular pulmonar y la presión sistólica del ventrículo derecho, lo cual con una técnica adecuada, es posible de observar a través del método ecocardiográfico [Zhu et al. 2019].

Si bien, el “Gold Standard” en el diagnóstico de HAP es cateterismo cardiaco derecho, se debe seguir un algoritmo en el que previamente, se hayan descartado otros procesos con métodos menos invasivos [Guerra et al. 2011]. Es así como se ha comprobado que ciertas variables de la ecocardiografía se correlacionan con el avance de la enfermedad, lo que permite la evaluación de la progresión y de la respuesta al tratamiento. [Guerra et al. 2011, Zerpa et al. 2019]

Para fines de evaluación, la ecocardiografía presenta distintas modalidades, entre ellas modo M, bidimensional y Doppler, cada una entregando información complementaria para establecer un panorama final de la función cardíaca [Sadeghpour et al 2022]. La ecocardiografía en modo M, envía una línea de exploración desde el transductor hacia el corazón, que junto a la modalidad bidimensional de la ecocardiografía, las convierte en un modo adecuado para registrar mediciones cuantitativas del movimiento, tamaño y masa cardíaca (Figura 1) [Sadeghpour et al 2022].

Otra modalidad de estudio ecocardiográfico es el uso de Doppler. El estudio Doppler es la base de la evaluación hemodinámica ecocardiográfica en el sistema cardiovascular. [Sadeghpour et al 2022]. Cuando las ondas sonoras golpean los objetos, algunas de las ondas sonoras se reflejan en la fuente de sonido. Si el reflector (está estacionario, las ondas sonoras reflejadas tendrán la misma frecuencia que las ondas sonoras emitidas por la fuente de sonido. [Rawshani et al. 2020] Cuando la fuente de sonido se mueve hacia el observador, las ondas sonoras se comprimen, lo que conduce a un acortamiento de la longitud de onda y por consecuencia un aumento de la frecuencia. Cuando la fuente de sonido se aleja del

observador, las ondas sonoras se estiran, lo que da como resultado un aumento de la longitud de onda y una disminución de la frecuencia. Este cambio de frecuencia se denomina efecto Doppler encontrado en 1842 por Christian Doppler [Rawshani et al. 2017].



**Fig. 1** – Modo M en Ecocardiografía, donde se aprecia la medición VI en Sístole y Diástole. (Adaptado de Rawshani A. 2020)

En el caso de la ecocardiografía, la fuente de sonido (Transductor) es estacionaria, en cambio, los objetos en movimiento son células sanguíneas (eritrocitos) y los tejidos (Miocardio) [Rawshani et al. 2017, Sadeghpour et al 2022].

Debido a que los eritrocitos son pequeños, redondos y tienen una superficie irregular reflejan una fracción de las ondas emitidas por el transductor sin embargo es suficiente para ser detectados por el ecocardiógrafo [Rawshani et al. 2017]. De esta forma, los eritrocitos que fluyen hacia el transductor reflejarán las ondas sonoras con mayor frecuencia y los eritrocitos que fluyen desde el transductor reflejarán ondas sonoras con frecuencia reducida [Rawshani et al. 2017]. De esta manera, el ecocardiógrafo utiliza el efecto Doppler para estimar la velocidad y la dirección de los objetos en movimiento. Para calcular la velocidad del flujo sanguíneo, se analiza la diferencia de frecuencia entre las ondas de ultrasonido emitidas y reflejadas, a lo que se denomina “desplazamiento Doppler” [Rawshani et al. 2017].

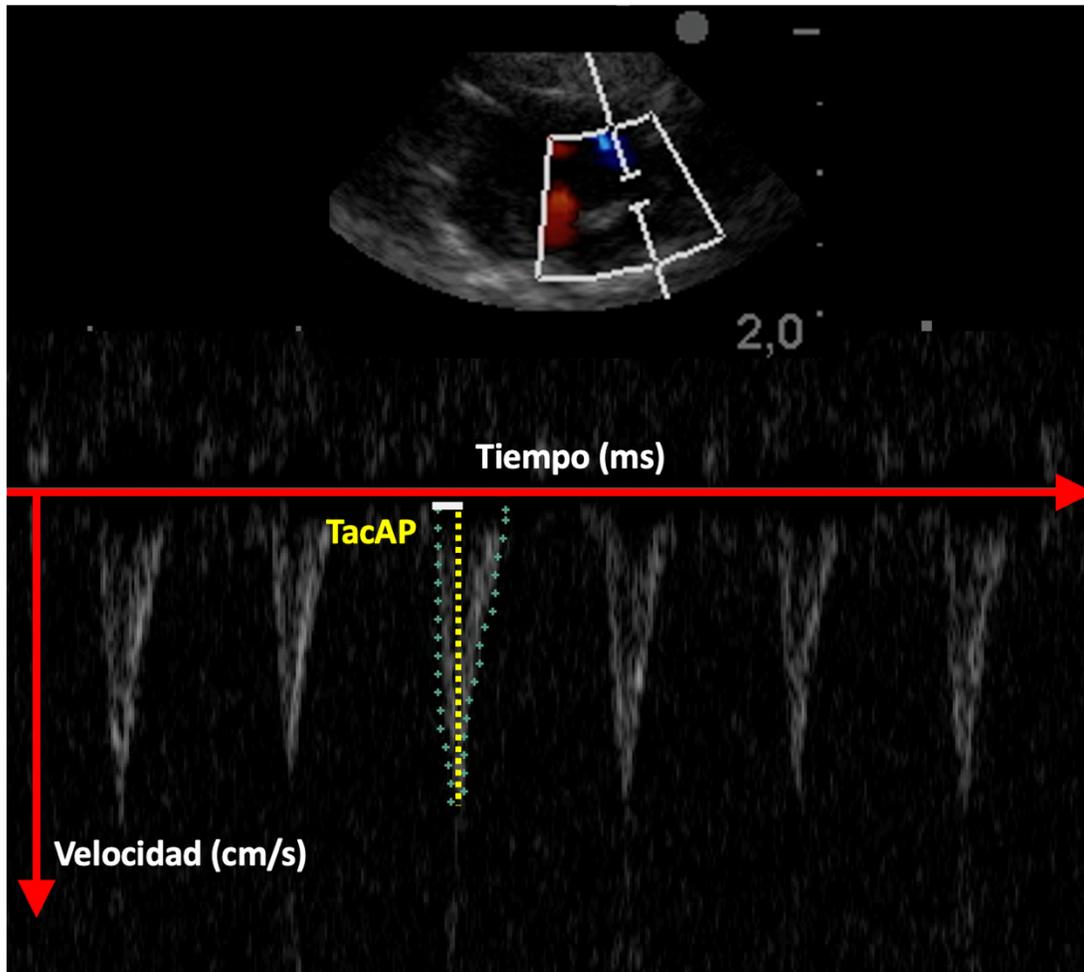
El Doppler ecocardiográfico puede usarse en onda pulsada (PW) o en onda continua (CW). El Doppler PW permite el estudio de la velocidad y la dirección del flujo sanguíneo en un sitio en particular sin embargo, posee dificultades para medir altas velocidades de manera confiable, mientras que la CW permite el análisis del flujo de alta velocidad a lo largo de toda la longitud del haz Doppler con la desventaja que no puede ubicar el lugar donde se generan las distintas velocidades. Independiente del tipo de onda usada, el ecocardiógrafo permite visualizar gráficamente la velocidad de flujo en el tiempo, la cual se representa como una curva sobre la línea de base en el caso que el flujo esté dirigido hacia el transductor o una curva bajo la línea de base, en el caso que el flujo que se aleje del transductor [Rawshani et al. 2017, Sadeghpour et al 2022].

El uso de onda pulsada en la ecocardiografía también permite una modalidad denominada Doppler color, la cual mapea la velocidad del flujo en múltiples ubicaciones dentro de un área y une estos datos en color. Por acuerdo, la velocidad del flujo hacia el transductor es rojo y la velocidad del flujo alejándose del transductor es azul. Las velocidades más altas se mapean como sombras más brillantes y un mosaico de color significa flujo turbulento. [Rawshani et al. 2017, Sadeghpour et al 2022].

Es importante saber que el estudio Doppler puede medir la velocidad del flujo y estimar el gradiente de presión a través de la ecuación de Bernoulli sin embargo, a pesar de los avances del método ecocardiográfico, no es mencionado por si solo para establecer el diagnóstico de la enfermedad, por lo que debe ser comprobado invasivamente a través de cateterismo cardiaco derecho. [Guerra et al. 2011, Zerpa et al. 2019, Sadeghpour et al 2022]

Tal como se mencionó anteriormente, la modalidad Doppler nos permite caracterizar el flujo sanguíneo durante el ciclo cardiaco y entregar información con utilidad diagnóstica en el caso de sobrecarga del ventrículo derecho. Una de las variables derivadas del estudio Doppler es el tiempo de aceleración de la arteria pulmonar (TacAP), la cual ha mostrado una correlación significativa ( $r=0,84-0,89$ ) con la medición invasiva de PAPm, especialmente en la HAP leve a moderada y ha sido mencionada como criterio pronóstico de la enfermedad en modelos de HAP por MCT en ratas [Koskenvuo et al. 2010]. El TacAP ha sido definido como el intervalo entre el inicio hasta la velocidad máxima del flujo de la arteria pulmonar [Koskenvuo et al. 2010] Figura 2. Se ha demostrado que un TacAP  $\leq 19$  ms es 64% sensible y 90% específico para detectar un aumento de la presión sistólica del ventrículo derecho mayor a 35,5 mmHg

[Spyropoulos et al. 2020] Desde el punto de vista clínico, una disminución del TacAP se debe a la reducción de la capacitancia, a la rigidez de la arteria pulmonar y al aumento de la resistencia del lecho vascular pulmonar, provocando que en la sístole cardiaca se produzca un aumento más rápido y una reducción de la velocidad del flujo sanguíneo [Wang et al. 2013, Spyropoulos et al. 2020].



**Fig. 2** – Modalidad Doppler Pulsado para la obtención del TacAP. En el eje de las ordenadas, se grafica el tiempo (ms) y en el eje de las abscisas la velocidad del flujo sanguíneo (cm/s). El variable TacAP representada como la línea blanca horizontal, corresponde al tiempo que tarda el flujo sanguíneo en alcanzar la máxima velocidad, esta última representada por la proyección del Peak de velocidad sobre el eje de las ordenadas (línea amarilla).

Según reportes, los cambios en el TacAP se hacen visibles desde la segunda semana posterior a la inyección de MCT lo cual da a la ecocardiografía ventajas para ser utilizada en estudios de HAP en modelos animales [Novelli et al. 2019].

Si bien la medición de regurgitación tricuspídea es una medición común para la evaluación de la HP en la práctica clínica, no todos los pacientes la poseen, lo que da al TacAP una ventaja como método complementario para la detección de HAP, sin dejar de considerar otras variables como función sistólica, precarga y dilatación del VD [Wang et al. 2013].

### **5.3 Inflamación en Hipertensión Pulmonar.**

La inflamación es un proceso que ha sido ampliamente reportado en los tejidos pulmonares en la HAP [Pietra et al. 1994, Zerneck et al. 2005, Schober et al. 2008, Rabinovitch et al. 2014, Chen et al. 2019]. Este proceso daña a la célula endotelial y por consiguiente a la regulación del sistema de coagulación-fibrinólisis, la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la migración de células inflamatorias [Steiner et al. 2009, Sakuma et al. 2019]. La lesión endotelial vascular pulmonar persistente es seguida por una fase proliferativa progresiva de células endoteliales resistentes a la apoptosis, de células del músculo liso y fibroblastos [Thompson et al. 2017, Sakuma et al. 2019, Oliveira et al. 2020]. Si bien existe variabilidad en los distintos procesos de proliferación en la HAP, se ha observado infiltrado inflamatorio perivascular e intersticial en todos los patrones patológicos de HAP humana y en modelos animales de monocrotalina, lo cual daría cuenta de una posible relación entre remodelación e infiltración perivascular [Gómez et al. 2012, Stacher et al. 2012].

Las citocinas son impulsoras y contribuyentes a la inflamación perivascular en la HAP. [Cowan et al. 2000, Soon et al. 2010] La interleucina-1 (IL-1) fue reconocida como mediadora de la HAP inducida por monocrotalina [Cowan et al. 2000, Soon et al. 2010]. Posteriormente se observaron citocinas inflamatorias en suero, como IL-6, IL-8, IL-20 e IL-12 y que presentan una fuerte correlación con la gravedad de enfermedad, potenciando el proceso de hipertrofia vascular y vasoconstricción [Cowan et al. 2000, Schermuly et al. 2011, Thompson et al. 2017, Sakuma et al. 2019, Oliveira et al. 2020]. Proceso similar se ha visto en ratas tratadas con monocrotalina, las cuales mostraron una mayor expresión de IL-6 en los pulmones, lo que perpetuaría la inflamación mediada por distintas células [Schermuly et al. 2011].

En parte, la presencia de citoquinas es consecuencia de la acción de distintos agonistas que de forma paracrina o autocrina tienen efecto sobre receptores celulares metabotrópicos y ionotrópicos prácticamente todos los tejidos presentes en el organismo y que en patologías como la HAP cobran una relevancia aun mayor (Chen et al. 2019).

#### **5.4 Receptores Metabotrópicos.**

Los receptores metabotrópicos son la familia de proteínas más diversa del genoma de los mamíferos y permiten desencadenar distintos efectos después de ser activados por una amplia variedad de ligandos, incluidos los neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas, factores de crecimiento, nucleótidos, quimiocinas, moléculas odorantes y fotones [Kroeze et al. 2003, Meriney et al. 2019]. Cuando el ligando se une a un receptor metabotrópico, la unión induce un cambio conformacional en la proteína receptora, lo que desencadena una cascada de señalización en el citoplasma [Kroeze et al. 2003, Meriney et al. 2019]. El vínculo entre la activación del receptor de membrana y la cascada de señales citoplasmáticas, corresponde a la proteína GDP heterotrimérica compuesta por la subunidad  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$  [Kroeze et al. 2003, Meriney et al. 2019]. Cuando un ligando, como por ejemplo una purina, se une a un receptor metabotrópico, induce un cambio conformacional en el cual GDP unido a  $\alpha$  se intercambia por GTP y se forma  $\alpha$ -GTP y  $\beta$ - $\gamma$  permanecen unidos a la membrana y pueden asociarse con otras proteínas para iniciar una cascada de señalización [Kroeze et al. 2003, Burnstock et al. 2004]. Dependiendo del tipo de proteína G, así como de los tipos de proteínas vecinas que se ven afectadas por las proteínas G heterotriméricas activadas, se puede iniciar una amplia variedad de cascadas de señalización que alteran la función celular, desencadenando efectos fisiológicos dependiendo el sistema involucrado [Kroeze et al. 2003]. Independiente del tipo de Proteína, los receptores metabotrópicos, inician y terminan su actividad de forma lenta, al mismo tiempo que tienen la capacidad de amplificar los efectos, dado los diversos efectos posibles de un solo ligando, debido a una multitud de vías de señalización mediadas por un segundo mensajero, lo cual permite ciertas ventajas sobre los receptores ionotrópicos [Mariney et al. 2019]. Existe una variedad de receptores metabotrópicos que cobran relevancia en procesos patológicos como la HAP. Dentro de esta categoría, se ha reportado la participación de receptores purinérgicos dentro de la etiología y progresión de la enfermedad, por lo que entender su función es imprescindible al momento de proponer métodos que permitan influir sobre la sintomatología de la HAP.

#### **5.5 Señalización Purinérgica.**

Las purinas son moléculas que desempeñan un papel central en el metabolismo energético de todas las formas de vida [Haydon et al. 2012, Conroy et al. 2016]. Los nucleótidos purinas (ADP, ATP) y pirimidinas (UTP, UDP) ejercen sus efectos a través de un tipo de receptores metabotrópicos llamados “receptores purinérgicos”, de los cuales se han identificado dos

familias: P<sub>1</sub> o receptores de adenosina y receptores P<sub>2</sub>, que reconocen tanto purinas como pirimidinas con distinta afinidad [Burnstock et al. 1985, Haydon et al. 2012, Conroy et al. 2016]. Dentro de los receptores P<sub>2</sub> fueron propuestos dos tipos, un grupo de receptores de membrana P<sub>2</sub>X denominados canales ionotrópicos con permeabilidad variable al Ca<sup>+2</sup> y el grupo de receptores de membrana P<sub>2</sub>Y acoplados a proteínas G metabotrópicas (GPCR) quienes participan en el control del tono liso vascular, foco de investigación de nuestro laboratorio [Conroy et al. 2016].

### **5.6 Receptores metabotrópicos purinérgicos P<sub>2</sub>Y**

Los receptores P<sub>2</sub>Y se expresan en prácticamente todos los tipos de tejidos biológicos y median una variedad de funciones, incluida la agregación plaquetaria, la proliferación de células musculares lisas y la regulación inmunitaria [Conroy et al. 2016]. Están compuestos por ocho miembros codificados por distintos genes que pueden subdividirse en dos grupos en función de su señalización primaria a través de proteínas G acopladas específicas [Conroy et al. 2016].

Desde el punto de vista de la secuencia, poseen 7 dominios de transmembrana que forman las zonas de unión a ligando, un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular que tiene la posibilidad de unirse a proteínas quinasas con alta especificidad [Burnstock et al. 1985, Kanagy et al. 2007]. Los receptores P<sub>2</sub>Y pueden subdividirse en dos categorías: El primer subgrupo incluye los receptores P<sub>2</sub>Y<sub>1,2,4,6,11</sub>, acoplados principalmente a proteína Gq, y el segundo subgrupo abarca los subtipos de receptores P<sub>2</sub>Y<sub>12,13,14</sub> acoplados a proteína Gi/0, difiriendo entre ellos en su selectividad por distintos nucleótidos [Burnstock et al. 2004, Harden et al. 2010, Conroy et al. 2016, Burnstock et al. 2017]. Dentro de este segundo subgrupo de receptores acoplados a proteína Gi/0, se encuentra el receptor P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub>, quien responde exclusivamente a UDP-Glc y donde este efector tiene como blanco solamente a P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub>. En este receptor es donde se enfocará nuestro estudio.

### **5.7 Actividad del Receptor P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub>.**

El receptor metabotrópico purinérgico P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub>, se encuentra acoplado a proteína Gi y su ARNm se ha detectado en una variedad de tejidos humanos incluidos cerebro, placenta, neutrófilos, linfocitos, células epiteliales de diversos tejidos y en músculo liso gastrointestinal [Burnstock et al. 2004, Conroy et al. 2016].

El receptor  $P_2Y_{14}$  se activa por azúcares como UDP-galactosa, UDP-ácido glucurónico, UDP-N-acetilglucosamina y UDP-Glc, este último actúa como el agonista más potente en roedores y humanos [Burnstock et al. 2004, Carter et al. 2009, Harden et al. 2010, Conroy et al. 2016]. UDP-Glc es un producto de las reacciones de glicosilación pero también pueden provenir como producto secretado por células lesionadas, así mientras la mayoría de los nucleótidos, como el ATP, se degradan rápidamente, UDP-Glc extracelular tiene una alta estabilidad en la mayoría de los tejidos y tipos de células, lo que podría conducir a concentraciones extracelulares elevadas [Battistone et al. 2020]. Concentraciones de UDP-Glc activan al receptor  $P_2Y_{14}$  el cual a través de la proteína acoplada  $G_i$ , inhibiría a adenililciclase, generando una disminución de AMPc intracelular, con la consecuente disminución de los niveles de PKA, involucrada en la activación de MLCP [Webb et al. 2003, Harden et al. 2010, Liu et al. 2018], por tanto conduciría a la inhibición de la actividad de MLCP que resulta en una permanencia en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina reguladora independiente de un cambio en  $Ca^{2+}$  [Khromov et al. 2009]. Es así como la estimulación o inhibición del receptor  $P_2Y_{14}$ , podría tener un rol importante en la actividad de MLCP y por consiguiente en el control de la fosforilación de la miosina y la generación de tensión dentro del músculo liso vascular [Khromov et al. 2009]. Consecuente con los hallazgos anteriores, el laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar ha demostrado que la estimulación con UDP-Glc produce contracción de VIP (menores a 200  $\mu m$ ) de forma dosis dependiente, además UDP-Glc 500  $\mu m$  indujo vasoconstricción máxima de 39,2% en ratas control sin embargo, ante la misma concentración de UDP-Glc, la contracción máxima fue de 89,9% en VIP provenientes de ratas con HAP inducida por MCT [Orellana et al. 2018]. En el mismo estudio, se determinó que en toda la longitud de las venas intrapulmonares pequeñas, la colocalización alfa actina de músculo liso y receptor  $P_2Y_{14}$  se mantiene cercana a 0,4 en ratas sanas y cercana a 0,6 en ratas con HAP inducido por MCT [Orellana et al. 2018].

De acuerdo a lo anterior, altas concentraciones intravasculares de nucleótidos podría inducir cambios en la expresión génica a nivel de las fibras musculares lisas de los vasos intrapulmonares y generar tanto un aumento en la expresión del receptor  $P_2Y_{14}$  a nivel del músculo liso de VIP, como también una mayor activación de la maquinaria contráctil del mismo [Burnstock et al. 2013, Casas et al. 2014].

Los mecanismos anteriores asociados a la presencia de procesos inflamatorios y stress mecánico, se relacionarían con la acumulación de UDP-Glc en las secreciones pulmonares

de pacientes con enfermedades pulmonares inflamatorias, lo que sugiere una relevancia fisiopatológica en la actividad autocrino/paracrino de  $P_2Y_{14}$  [Scrivens et al. 2006, Harden et al. 2010].

### **5.8 Papel del Receptor $P_2Y_{14}$ en procesos fisiopatológicos.**

Se ha observado que la estimulación del receptor  $P_2Y_{14}$  con UDP-Glc, podría estar involucrada en otras vías de señalización como PI3K, GPCRK2, GPCRK3, PLC, MAPK y en la regulación positiva de la expresión y fosforilación de STAT1 que es un factor de transcripción clave en los procesos inflamatorios [Ma et al., 2020, Klaver et al., 2021]. El hallazgo que la activación de los receptores  $P_2Y_{14}$  inducen la expresión de genes inflamatorios durante la activación de macrófagos, apoya la idea de que los agonistas del receptor  $P_2Y$  son generalmente proinflamatorios [Ma et al., 2020, Klaver et al., 2021]. Al mismo tiempo, la alta presencia del receptor  $P_2Y_{14}$  en neutrófilos, apoya la idea de la importancia inflamatoria del receptor, mas aun considerando que los neutrófilos son la población de leucocitos circulante predominante, participan en modular la inmunidad y constituyen la primera línea de defensa para erradicar la infección [Lazarowski et al. 2015]. Los neutrófilos son reclutados perivascularmente y participan en la liberación de enzimas proteolíticas como NE en pacientes y también en modelos de HAP hipóxica e HAP inducida por monocrotalina en ratas [Schultze et al. 1991]. Este antecedente cobra relevancia aún más al saber que los neutrófilos polimorfonucleares son el tipo de célula humana periférica con mayor expresión de ARNm de  $P_2Y_{14}$  [Moore et al. 2003, Harden et al. 2010, Sesma et al. 2012] y donde la presencia de UDP-Glc, estimularía la motilidad, movilidad y quimiotaxis de neutrófilos [Sesma et al. 2012], proponiendo a UDP-glucosa como un novedoso e importante contribuyente local a la inflamación neutrofílica a través de  $P_2Y_{14}$  [Müller et al. 2005, Sesma et al. 2012]. Considerando la visión proinflamatoria del receptor  $P_2Y_{14}$  lleva a la conclusión de que los antagonistas pueden usarse para tratar afecciones inflamatorias [Klaver et al., 2021].

En este aspecto, el compuesto no nucleotídico, PPTN fue reportado como un antagonista competitivo de alta afinidad en el receptor  $P_2Y_{14}$  cuando se administró por instilación nasal durante 12 días en ratones neonatales con sobreexpresión la subunidad  $\beta$  del canal de sodio epitelial ENaC [Sesma et al. 2016]. La administración de PPTN 100  $\mu$ M (1 $\mu$ l/gr peso) disminuyó significativamente los niveles de neutrófilos y de sustancia quimiotáctica en el lavado broncoalveolar en este modelo animal [Conroy et al. 2016, Sesma et al. 2016].

Si bien se ha descrito disminución de efectos inflamatorios posteriores al bloqueo de  $P_2Y_{14}$ , esto no se ha visto en tejido vascular pulmonar en HAP, donde el bloqueo de la infiltración de neutrófilos podría ser determinante en distintos aspectos de la progresión de la enfermedad, como la sobrevida o la capacidad cardiorespiratoria [Le et al. 2019].

### **5.9 Hipertensión Arterial Pulmonar y Capacidad cardiorespiratoria**

La HAP afecta negativamente la capacidad de ejercicio [Leggio et al. 2018] debido a una serie de procesos involucrados, como la remodelación y el subsecuente estrechamiento de la luz vascular en vasos intrapulmonares y aumento en la presión de la arteria pulmonar. La alteración en la matriz extracelular, con depósito de colágeno en adventicia, resultan en una reducción de la distensibilidad, lo que dificulta absorber aumentos considerables en el gasto cardíaco, situación que se hace más notoria durante el ejercicio, colocando una limitación funcional a su desarrollo junto a la aparición de acidosis láctica a baja tasa de trabajo contribuyendo a la aparición de disnea temprana [Jeffery et al. 2001, Paolillo et al. 2012] que se hace visible en las pruebas de ejercicio incremental las cuales son un procedimiento estándar para determinar las variables fisiológicas submáximas y máximas [Bentley et al. 2007].

Resultados anteriores obtenidos en el Laboratorio de Dinámicas Broncovasculares y Daño Pulmonar, muestran que la administración de suramina, aumenta la sobrevida y la velocidad aeróbica peak en pruebas submáximas de ratas HAP [Barros et al. 2018]. Posteriormente en el mismo laboratorio se encontró una contracción importante en venas pulmonares en respuesta a UDP-Glucosa, lo cual tendría relación con la presencia de receptores purinérgicos  $P_2Y_{14}$ , siendo los únicos resultados disponibles en venas pulmonares [Orellana et al. 2018]. Es importante dilucidar, si el bloqueador específico del receptor  $P_2Y_{14}$ , genera cambios manifestados en variables cardiorespiratorias, como consecuencia de cambios inflamatorios alrededor de vasos intrapulmonares y en la hipertrofia del Ventrículo Derecho en un modelo de ratas con HAP inducido por monocrotalina.

### **5.10 Modelo Animal de HAP inducido por Monocrotalina.**

El modelo de HAP inducido por MCT ha sido fundamental para el diseño de estrategias terapéuticas eficaces, teniendo las ventajas de la simplicidad técnica, reproducibilidad y bajo costo en comparación con otros modelos de HAP como la inducción de la enfermedad por Hipoxia [Gómez-Arroyo et al., 2011, Bueno-Beti et al., 2018]. La MCT es un alcaloide derivado

de la planta *Crotalaria Spectabilis*, el cual una vez inyectado al animal genera reacciones hepáticas mediadas por Citocromo P-450 y que terminan en el reactivo deshidromonocrotalina [Wilson et al., 1992, Gómez-Arroyo et al., 2011, Bueno-Beti et al., 2018]. Existe evidencia sobre el efecto de dosis dependiente de MCT, donde se ha demostrado que el umbral mínimo para generar HAP es a través del consumo de agua con 20 mg/l de MCT por 4 días, no es necesario un período de 4 días para estimular los procesos fisiológicos que producen hipertensión pulmonar, dado que la dosis única de 60 mg/kg de MCT induce los procesos propios de la enfermedad en humanos [Shubat et al., 1989]. El mecanismo por el cual los derivados de la MCT inducen cambios no es completamente entendido, sin embargo se sabe que una vez inyectada genera remodelación vascular pulmonar obstructiva, caracterizada por estrechamiento y/o obliteración del lumen vascular, hipertrofia de las células del músculo liso de la capa media en arterias pulmonares, generando incremento en la resistencia al flujo sanguíneo con una consecuente sobrecarga en el ventrículo derecho, quien compensa inicialmente con hipertrofia pero la progresión de la enfermedad lleva a una falla cardíaca [Kolettis et al., 2007, Gómez-Arroyo et al., 2011].

En resumen, es posible mencionar que el modelo de MCT es un método confiable para reproducir los cambios fisiopatológicos asociados a la progresión de la HAP. Experiencias anteriores en nuestro laboratorio, permitieron comprobar Hipercontractibilidad de VIP provenientes de ratas con HAP cuando eran estimuladas con UDP-Glc, agonista específico del receptor  $P_2Y_{14}$ . El receptor  $P_2Y_{14}$  ha sido hallado en una serie de tejidos, especialmente células polimorfonucleares, donde la estimulación específica del receptor estaría asociado a la expresión de genes inflamatorios, motilidad, movilidad y quimiotaxis de neutrófilos. Debido a lo expuesto, se plantea que el bloqueo específico del receptor  $P_2Y_{14}$  con el compuesto no nucleotídico PPTN, tendría una función antiinflamatoria, lo que mejoraría la función cardiorespiratoria y sobrevivida en un modelo de ratas con HAP.

## **6. HIPÓTESIS**

El tratamiento antipurinérgico específico para el receptor  $P_2Y_{14}$  mejora la función cardiorespiratoria, en un modelo de ratas con Hipertensión Arterial Pulmonar.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto en la función cardiorespiratoria del tratamiento antipurinérgico específico para el receptor  $P_2Y_{14}$  en un modelo de ratas con Hipertensión Arterial Pulmonar.

### **7.2 Objetivo Específicos**

Originalmente había sido propuesto un grupo de animales Sanos, tratados con PPTN, sin embargo por motivos de la emergencia sanitaria actual, se decidió prescindir de este grupo dado su menor aporte a comprobar la hipótesis del estudio. Para fines del siguiente avance, se abordaron todos los objetivos específicos trabajando con 5 animales del grupo ratas sanas (C), 8 animales del grupo de ratas enfermas (HAP) y 7 animales del grupo de animales tratados con el bloqueador específico del receptor  $P_2Y_{14}$  (HAP+PPTN).

Los objetivos específicos son:

1. Determinar y comparar la relación en la masa ventricular derecha en los tres grupos experimentales.
2. Caracterizar y comparar el comportamiento de variables ecocardiográficas en un modelo animal de hipertensión Pulmonar.
3. Determinar y comparar la capacidad cardiorrespiratoria en los tres grupos experimentales.
4. Realizar y comparar curvas de supervivencia entre los tres grupos experimentales.

Considerando la eliminación del Grupo de animales sanos tratados con PPTN, es posible decir que los objetivos específicos fueron abordados cada uno de ellos en un 100%.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Tipo de estudio.**

Este proyecto corresponde a un estudio de tipo prospectivo, longitudinal y experimental.

### **8.2. Cálculo de Tamaño muestral**

Barros et al. 2018, lograron un aumento estadísticamente significativo de un 44% en la sobrevivencia de animales HAP, posterior a la utilización del bloqueador purinérgico inespecífico suramina. Utilizando este porcentaje de aumento en la sobrevivencia, para obtener un resultado similar con un nivel de confianza de 95% y un poder estadístico 80%, se calculó el tamaño muestral asociado considerando un 15% de pérdidas, por lo que el resultado fue de 7 animales por grupo lo que da un total de 21 ratas. Experiencias previas en nuestro laboratorio muestran la baja variabilidad en los parámetros medidos en el grupo sano, lo que nos llevó a disminuir el número de animales sanos considerando aspectos bioéticos. En los grupos de animales HAP y HAP tratados con PPTN, se consideró el número máximo de animales, para contrastar la hipótesis de la investigación.

### **8.3. Animales.**

Todos los procedimientos fueron ejecutados en concordancia con las guías nacionales de manejo de animales y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, código CBA 1094 año 2019.

Se utilizaron ratas macho, especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague Dawley de edad mayor de 42-45 días con pesos iniciales entre 200-300 g.

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos correspondientes a:

- Grupo ratas sanas - (Vehículo de MCT) (n= 5)
- Grupo de ratas con HAP (n= 7)
- Grupo de ratas con HAP y tratamiento de PPTN intratraqueal (n= 7)

Considerando experiencias previas en nuestro laboratorio, las que muestran una baja variabilidad en los parámetros medidos animales sanos, nos llevó a disminuir el número de animales de este grupo, considerando aspectos bioéticos, teniendo un número final de 5 animales.

#### 8.4. Procedimientos.

Para inducir HAP se utilizó una dosis 60 mg/kg de MCT que se administró por medio de una inyección única por vía subcutánea el día 14 de iniciado el estudio, el grupo control recibió una inyección de vehículo sin MCT en la misma dosis y vía. Se evaluó una vez a la semana la capacidad cardiorrespiratoria, la escala de sufrimiento animal y Ecocardiografía según se detallará posteriormente, hasta cumplir con los criterios de Eutanasia, como se esquematiza en la Figura 3.

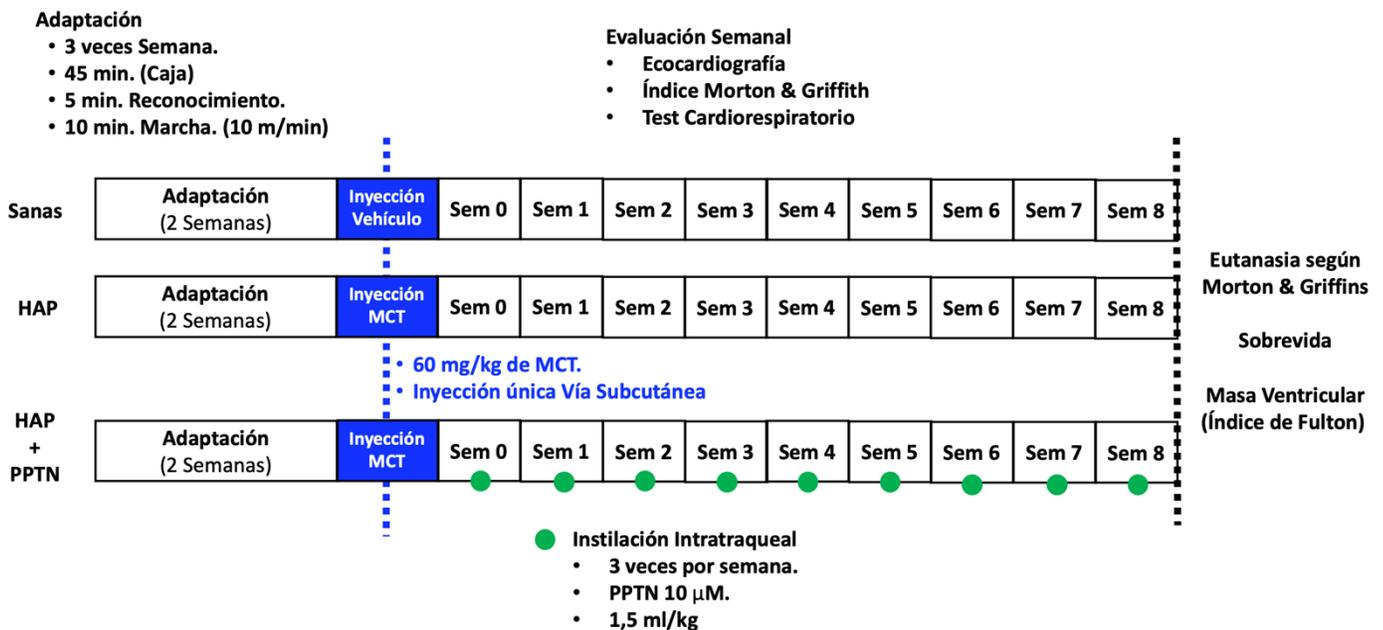


Fig. 3 – Esquema general del proceso Experimental.

#### 8.5. Modelo de Hipertensión Arterial Pulmonar en ratas con Monocrotalina.

Se utilizó una dosis 60 mg/kg de MCT y se administró por medio de una inyección única por vía subcutánea al día 14 de iniciado el estudio a los animales de los grupos experimentales y los animales de los grupos control recibieron una inyección de vehículo sin MCT en la misma dosis y vía. [Ryan et al. 2011, Gómez et al. 2012, Bueno-Beti et al., 2018].

#### 8.6. Evaluación por Ecocardiografía.

Se realizaron exámenes ecocardiográficos seriales completos semanalmente, durante el proceso experimental.

Previo a la evaluación, se realizó tricotomía a los animales en la región torácica con rasuradora eléctrica para mejorar la superficie de contacto. Posteriormente fueron anestesiados a través de la inhalación de isoflurano al 3% en cámara de inducción y luego fueron mantenidos a 1,5% de isoflurano por máscara facial y fijados sobre un pad homeotérmico para control de la temperatura corporal durante el procedimiento.

Para el presente estudio fue utilizado un ultrasonido Vivid-I (General Electric Inc. Estados Unidos) con el transductor iRL-RS, 5-13 MHz, profundidad de campo de 6 cm y campo de visión de 25 mm. Las variables SIVd, DVId, PPVId y DVIs, se evaluaron a través de la vista paraesternal en el eje corto del corazón a nivel de músculo papilares medio en modo M. También se utilizó un ecocardiógrafo Sonosite M-turbo (Sonosite/Fujifilm, EEUU) con un transductor electrónico de Phase array de 8-4 MHz, profundidad de campo de 14 cm y campo de visión de 25 cm. Por ecocardiografía bidimensional, se determinó el espesor de la pared, cavidad ventricular izquierdo, cavidad diastólica terminal izquierda y fracción de eyección.

En el estudio Doppler de flujo de transpulmonar y tracto de salida ventricular derecha fue obtenido en una vista eje corte transverso en base cardíaca para la evaluación del flujo de salida VD. Los índices Doppler incluyen el Tiempo de aceleración (TacAP) fueron evaluados por Doppler de pulsado y continuo en modo espectral.

### **8.7. Capacidad cardiorespiratoria.**

Los animales fueron sometidos a periodo de adaptación de 14 días en el cual 3 veces por semana caminaron sobre un treadmill durante 10 minutos a velocidad constante de 10 m/min. Cuando la rata llegó con sus patas traseras a la rejilla posterior del treadmill, le fue aplicado un puff de aire comprimido para estimular el movimiento [Barros et al. 2018].

Para la medición de la capacidad cardiorrespiratoria, una vez a la semana las ratas fueron trasladadas en cajas desde el bioterio hasta la ubicación del treadmill, la cual fue la zona de trabajo dentro del laboratorio. Las ratas permanecieron entre 45 minutos y 1 hora previos a la evaluación, periodo en que fueron pesadas y colocadas en el treadmill al interior de una caja de acrílico donde se les permitió explorar 5 minutos previos al inicio de la prueba.

El test de evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria consistió en un test escalonado a 0° de inclinación, iniciando a 10 m/min y que aumentó la velocidad en 1,67 m/min cada dos minutos hasta que la rata alcanzó la fatiga, definida como el momento en que la rata a pesar de 3 estímulos de aire comprimido no fue capaz de continuar corriendo o permaneció 5

segundos en la rejilla posterior del treadmill. Cuando se cumplieron los criterios de fatiga, se procedió a detener el treadmill y se le permitió al animal descansar 5 minutos antes de ser devuelto a su caja. Entre cada evaluación se eliminaron las heces y la orina que pudieran haber quedado en el treadmill y al finalizar todas las evaluaciones se limpió con alcohol al 75%. El tiempo máximo es definido como el máximo alcanzado por el animal alcanzado en la ejecución de la prueba en el Treadmill.

#### **8.8. Instilación Intratraqueal.**

Las ratas se anestesiaron mediante inhalación de isofluorano al 3% en cámara de inducción, posteriormente se ubicaron en una plataforma de sujeción en un ángulo de 60° (aproximadamente) en posición supina suspendido desde los incisivos y se iluminó externamente en la zona laríngea con un iluminador de alta intensidad (Ni-150, Nikon Industries, EE.UU). Se realiza apertura bucal con pinza quirúrgica hasta observar el cartílago cricoideo y se insertó catéter poliuretano 18G (Nipro, medical corporation, Ecuador) por vía transoral hasta una profundidad de aproximadamente 6 cm desde la comisura de la boca, lo que asegura llegar a un nivel de profundidad previo a la bifurcación bronquial.

PPTN (Sigma-Aldrich Industries, EE.UU) es disuelto en 0,075 ml de DMSO, para posteriormente formar una disolución con 7,42 ml de suero fisiológico, previo a la administración por instilación intratraqueal. Si bien, se han reportado toxicidad del DMSO, en ratas dicho efecto es sobre 9,9 ml/kg cuando el DMSO se administra por vía intraperitoneal. De acuerdo a los protocolos manejados en el presente estudio, en cada instilación se administra 0,015 ml/kg de DMSO (representando el 1% del total de la solución), descartando posibles efectos adversos atribuidos al DMSO como solvente [Kelava et al. 2011]. Posterior a la preparación de la solución de PPTN, se administró un volumen de 1,5 ml/kg de PPTN a una concentración de 10 $\mu$ M, a través de una jeringa conectada a una aguja de sonda.

Una vez realizada la instilación, se confirma visualmente que la suspensión no fluye hacia el esófago desde la tráquea. Después de la instilación, los animales fueron inmovilizados para mantener la posición corporal hasta la recuperación. [Hasegawa-Baba et al. 2014, Kobayashi et al. 2016, Kobayashi T. et al. 2019, Senoh et al. 2020]

#### **8.9. Escala Morton & Griffiths.**

Semanalmente se utilizó para procedimientos experimentales la escala de supervisión de animales de Morton y Griffiths, la cual permite cuantificar el dolor y aflicción de los animales causados por determinados procedimientos, de modo de tomar las medidas apropiadas y

aliviarlos. El protocolo considera 5 características: pérdida de peso, aspecto, comportamiento espontáneo, comportamiento frente la manipulación y constantes vitales. De acuerdo a la puntuación total, se determinó el momento en que se debía realizar el proceso de eutanasia [Morton et al. 1985].

#### **8.10. Eutanasia.**

Las ratas fueron eutanasiadas a través de una inyección anestésica de ketamina (180 mg/kg) – xilazina (18 mg/kg) vía intraperitoneal. Se administró con el fin de generar una narcosis previa al método físico de eutanasia que correspondió a la apertura torácica bajo anestesia profunda.

#### **8.11. Índice de Fulton.**

El corazón fue seccionado y se pesó la pared libre de ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo más el tejido del tabique. La hipertrofia del ventrículo derecho se calculó como la relación en peso de ventrículo derecho y ventrículo izquierdo + septum.

Se ha reportado que el Índice de Fulton (IF)  $\geq 0,34$  posee una sensibilidad de 94% y una especificidad del 97% para distinguir animales con HAP de animales sanos. [Spyropoulos et al. 2020]

#### **8.12. Análisis estadístico.**

Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 8.1.0 para macOS. Los resultados están expresados como mediana y rangos intercuartílicos. Para establecer la normalidad de los datos se utilizó el Test de Agostino & Pearson. Cuando los datos no tenían una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar muestras independientes y los test de Friedman y Wilcoxon para muestras dependientes. Finalmente, el análisis de supervivencia se realizó por medio de la construcción de la curva de Kaplan-Meier. Se consideró una significancia estadística con un  $p < 0,05$ .

## 9. RESULTADOS.

Fueron evaluados 19 animales de entre 61 y 67 días, pertenecientes al grupo de animales sanos, grupo Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) y el grupo de animales con HAP y tratamiento con bloqueador específico del receptor P2Y<sub>14</sub> (HAP+PPTN). Como se puede apreciar en la tabla 2, al final del experimento, los grupos HAP y HAP+PPTN tuvieron una disminución significativa del peso respecto a los animales sanos.

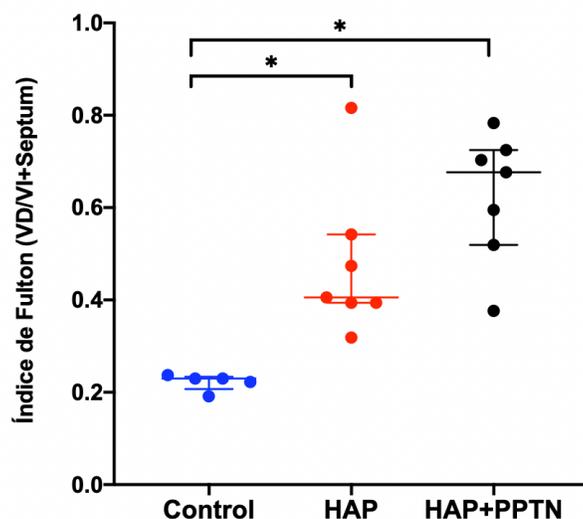
Muestra	Sanas	HAP	Valor p	HAP+PPTN	Valor p
Número (n)	5	7		7	-
Peso inicial (g)	351 (336-373)	350 (336-375)	0,9999	337 (315-348)	0,4533
Peso Final (g)	565 (526-608)	398 (377-474)	<b>0,0426</b>	326 (280-498)	<b>0,0031</b>

**Tabla 2:** Comparación intergrupos. **n:** número; **g:** gramos. En negrita se destacan valores significativos en relación al grupo sano. Valor  $p < 0,05$  mediante test Kruskal-Wallis. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

### 9.1. Índice de fulton.

Dado que la inducción de Hipertensión pulmonar, es dependiente de la inyección subcutánea de monocrotalina, es necesario corroborar efectivamente que dicha condición se cumple en el grupo experimental. En este ámbito, el índice de fulton, que relaciona el peso del ventrículo derecho (VD) con el peso del ventrículo izquierdo más el septum (VI + septum), nos permite identificar la presencia de hipertrofia del ventrículo derecho del corazón, consistente con un aumento en la resistencia vascular pulmonar, gráfico posible de ver en la figura 4. En la figura se muestra una mediana de 0,22 (0,20 – 0,23) (n= 5) para el grupo sano, mientras que el grupo HAP y HAP+PPTN fueron significativamente mayores con una mediana de 0,40 (0,39 – 0,54) (n=7) y 0,67 (0,51 – 0,72) (n=7) respectivamente.

En la tabla 3 se detallan los pesos del ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo + septum (n=19) al momento de la eutanasia. Se aprecia que el peso del ventrículo derecho presenta un aumento significativo en grupos HAP y HAP+PPTN en relación al VD de ratas sanas ( $p = 0,0007$ ) lo que nos permite inferir que el aumento de masa muscular en la pared del VD sería una respuesta ante el aumento en la resistencia al flujo sanguíneo pulmonar respecto a los animales sanos.



**Fig. 4** – Comparación de Índices de Fulton de ratas sanas, HAP y HAP+PPTN. Relación entre ventrículo derecho y ventrículo izquierdo más septum (VD/VI+septum). (\*) Valor  $p < 0,05$  mediante test Kruskal-Wallis. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

Variable	Sanas (n=5)	HAP (n=7)	Valor $p$	HAP+PPTN (n=7)	Valor $p$
Peso VD (g)	0,24 (0,22-0,26)	<b>0,40 (0,35-0,42)</b>	<b>0,0404</b>	<b>0,48 (0,38-0,55)</b>	<b>0,0030</b>
Peso VI + Septum (g)	1,07 (1,00-1,24)	0,93 (0,85-0,97)	0,1501	<b>0,78 (0,63-0,95)</b>	<b>0,0239</b>
Peso Total (VD+VI+Septum) (g)	1,31 (1,23-1,50)	1,34 (1,24-1,50)	0,9999	1,27 (1,09-1,58)	0,9999
Índice de Fulton	0,22 (0,20-0,23)	0,40 (0,39-0,54)	<b>0,0342</b>	0,70 (0,44-0,75)	<b>0,0014</b>

**Tabla 3:** Caracterización animales del grupo sano y grupos experimentales. Comparación de masa cardiaca en relación al grupo de animales sanos. Valor destacado en negrita  $p < 0,05$  son significativos mediante test Kruskal-Wallis. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

## 9.2. Ecocardiografía.

Nos hemos propuesto caracterizar de una forma cuantitativa el efecto de la monocrotalina en la inducción de la condición de Hipertensión Pulmonar a través de los parámetros ecocardiográficos. Todos los animales del estudio, fueron evaluados ecocardiográficamente. Si bien, el experimento tenía una duración total de 8 semanas, se consideró la semana 4 para la realización de comparaciones estadísticas, dado que la disminución del número de animales asociados a la mortalidad, entregaba datos estadísticos que no eran del todo confiables para inferir de forma adecuada lo que estaba sucediendo desde el punto de vista

de la función cardiaca. Las variables obtenidas para el VI, no presentaron diferencias significativas entre la primera medición y la medición a la cuarta semana, lo cual está expresado en la Tabla 1.

Efecto ecocardiográfico del tratamiento PPTN en ratas HAP.									
	Sanas			HAP			HAP+PPTN		
	Basal	Final	p	Basal	Final	p	Basal	Final	p
<b>SIVd</b> (mm)	1,64 (1,50-1,75)	1,67 (1,59-2,05)	0,6250	1,61 (1,51-1,92)	1,58 (1,46-2,60)	0,8125	2,20 (1,60-2,20)	2,00 (1,80-2,20)	0,9999
<b>DVID</b> (mm)	7,20 (7,00-7,51)	7,97 (7,36-8,09)	0,0625	7,27 (5,50-7,97)	7,45 (6,52-8,41)	0,9999	6,20 (4,90-6,30)	6,10 (4,90-6,70)	0,8125
<b>PPVID</b> (mm)	1,79 (1,77-2,04)	2,04 (1,68-2,31)	0,4375	2,20 (1,96-2,21)	2,00 (1,92-2,31)	0,9999	2,20 (2,10-3,00)	2,70 (2,00-3,80)	0,4688
<b>DVIs</b> (mm)	4,29 (3,96-4,89)	4,75 (4,24-5,32)	0,3125	4,38 (2,60-5,34)	4,35 (3,86-5,19)	0,6250	2,70 (1,80-3,80)	3,60 (1,70-4,60)	0,8438
<b>FE</b>	77,00 (68,00-80,34)	76,33 (68,67-78,50)	0,9999	77,67 (64,00-88,50)	78,00 (70,67-78,84)	0,8125	88,00 (78,00-93,00)	78,00 (65,00-94,00)	0,4688
<b>GC</b> (%)	0,25 (0,24-0,26)	0,27 (0,24-0,29)	0,4375	0,23 (0,15-0,26)	0,20 (0,20-0,38)	0,6250	0,20 (0,10-0,20)	0,20 (0,20-0,20)	0,5000
<b>FC</b> (l/min)	348,3 (334,0-410,7)	93,60 (85,74-96,07)	0,4375	372,3 (344,8-381,5)	105,1 (88,65-107,6)	0,8125	400 (375,0-400,0)	100,9 (87,15-115,5)	0,8125

**Tabla 1** – Comparación intragrupo de variables ecocardiográficas entre la evaluación basal y a la cuarta semana para grupo de ratas sanas, HAP y tratadas (HAP+PPTN) para el Ventrículo Izquierdo. No se presentan diferencias estadísticamente significativas. Valor  $p < 0,05$  a través de Test de Wilcoxon. (rango intercuartílico). Datos no cumplen criterio de normalidad

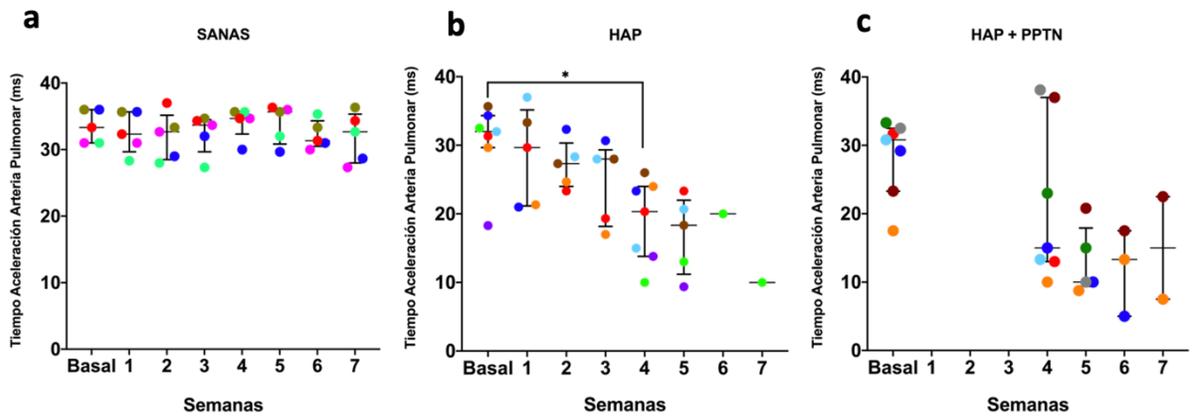
En el caso de las mediciones del VD, el procedimiento realizado semanalmente, mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los grupos HAP y HAP+PPTN en las variables  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $V_{med}$ ,  $maxG$ ,  $meanP$  a la cuarta semana en relación a la medición basal. La variable  $VTI$  fue estadísticamente significativa en el grupo HAP+PPTN a la cuarta semana (Sem 4) y la variable  $TacAP$  fue estadísticamente significativa en el grupo HAP a la cuarta semana en comparación a su medición basal, lo cual es posible observar en la tabla 4.

En el primer avance, fue posible demostrar que el TacAP es una medida útil para estimar la presencia de HAP, mostrando una disminución significativa desde la cuarta semana a diferencia de las otra variables ecocardiográficas (Spyropoulos et al. 2020).

<b>Efecto en variables ecocardiográficas del tratamiento con PPTN en ratas HAP.</b>									
	<b>Sanas</b>			<b>HAP</b>			<b>HAP+PPTN</b>		
	<b>Basal</b> n=5	<b>Sem 4</b> n=5	<b>p</b>	<b>Basal</b> n=7	<b>Sem 4</b> n=7	<b>p</b>	<b>Basal</b> n=7	<b>Sem 4</b> n=7	<b>p</b>
<b>Vmax</b> (m/s)	1,07 (1,01-1,17)	1,22 (1,14-1,32)	0,0625	1,11 (0,95-1,28)	1,03 (0,48-1,13)	<b>0,0312</b>	1,16 (0,93-1,26)	0,81 (0,71-0,98)	<b>0,0156</b>
<b>Vmed</b> (m/s)	0,66 (0,63-0,69)	0,74 (0,66-0,80)	0,0625	0,71 (0,65-0,82)	0,54 (0,34-0,66)	<b>0,0156</b>	0,80 (0,61-0,87)	0,60 (0,49-0,65)	<b>0,0312</b>
<b>máxG</b> (mmHg)	4,68 (4,11-5,51)	6,01 (5,33-7,01)	0,0625	4,96 (3,73-6,55)	4,19 (0,92-5,13)	<b>0,0156</b>	5,42 (3,50-6,47)	2,66 (2,03-3,83)	<b>0,0156</b>
<b>meanP</b> (mmHg)	2,14 (1,98-2,41)	2,65 (2,29-3,20)	0,0625	2,21 (1,71-3,32)	1,57 (0,48-2,03)	<b>0,0156</b>	2,57 (1,51-3,04)	1,47 (0,97-1,69)	<b>0,0312</b>
<b>VTI</b> (cm)	5,23 (4,82-5,80)	6,63 (6,01-7,40)	0,0625	5,90 (4,53-6,13)	4,43 (1,07-5,50)	0,0781	6,12 (5,22-6,78)	3,03 (2,28-3,37)	<b>0,0156</b>
<b>TAcAP</b> (ms)	33,33 (31,00-36,00)	34,67 (32,34-35,67)	0,8125	32,00 (29,67-34,33)	20,33 (13,80-24,00)	<b>0,0156</b>	30,80 (23,30-32,50)	15,00 (13,00-37,00)	0,1562

**Tabla 4** – Comparación intragrupo de variables ecocardiográficas entre la evaluación basal y a la cuarta semana para grupo de ratas sanas, HAP y HAP+PPTN. En negrita se destacan valores significativos. Valor  $p < 0,05$  a través de Test de Wilcoxon. (rango intercuartílico).

El tiempo de aceleración de la arteria pulmonar (TacAP), presentó una disminución significativa en el grupo HAP a la cuarta semana (20,3 (13,8-24,0)) en relación a la medición basal (30,8 (23,3-32,5) (n=7)) (Figura 5b), lo cual no se observó en el grupo HAP+PPTN (n=7)(Figura 5c). Los grupos HAP y HAP+PPTN mantuvieron el número de animales a la cuarta semana del experimento, lo que permitió la realización de análisis estadísticos, posterior a esa fecha, se presenta pérdida de animales en la medida que avanzaba el estudio asociado a mortalidad, posible de observar en las Figuras 5b y 5c. En las ratas sanas (n=5) no se encontraron diferencias significativas, no existiendo variación del tiempo de aceleración de la arteria pulmonar a lo largo de las semanas (Figura 5a).



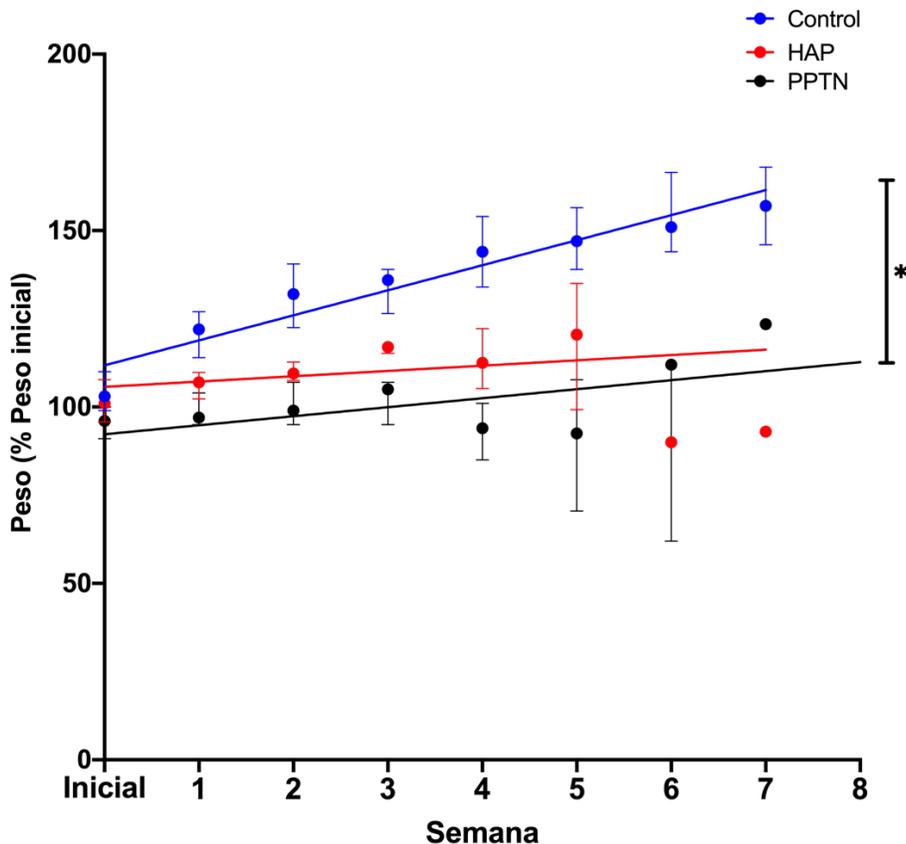
**Fig. 5.-** Comparación del tiempo de aceleración de la arteria pulmonar en relación a la medición basal para cada uno de los grupos de ratas del estudio. Cada color representa un animal distinto. Diferencias significativas \*  $p < 0,05$  a través de Test de Wilcoxon. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

### 9.3. Ingesta y Peso.

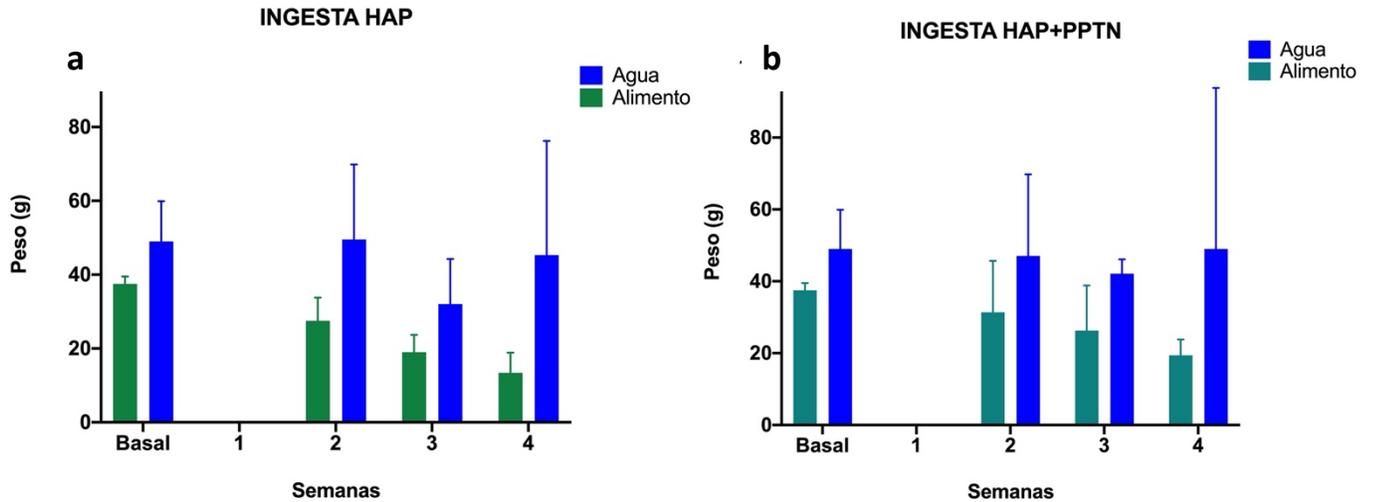
Se realizó un seguimiento de la curva de peso desde el inicio del proceso experimental para cada uno de los grupos del experimento. En la figura 6, se observan las curvas de peso en relación a las 8 semanas de duración del experimento, normalizado por el peso inicial de los animales. Todos los animales son homogéneos al inicio del experimento.

Al comparar el peso para los distintos grupos, se observa un aumento de peso con mayor pendiente de la curva, en ratas pertenecientes al grupo sano, sin embargo la pendiente de peso no posee el mismo ascenso en animales de los grupos HAP ( $n=7$ ) y HAP+PPTN ( $n=7$ ). Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo sano y el grupo HAP+PPTN. Los grupos HAP y HAP+PPT mantuvieron el número de animales a la cuarta semana del experimento, lo que permitió la realización de análisis estadísticos, posterior a esa fecha, se presenta pérdida de animales en la medida que avanzaba el estudio asociado a mortalidad.

Se consideró el control de Ingesta para los animales de los distintos grupos. Se realizó una evaluación basal en la semana 2, coincidente con la administración de PPTN para el grupo tratado. Se realizaron posteriormente valoraciones semanales hasta la semana 4, imposibilitados de continuar debido a complicaciones asociadas al periodo de cuarentena y pandemia. Es posible ver que tanto en el grupo HAP (n=7) y HAP+PPTN (n=7) se produjo paulatinamente un descenso en el consumo de alimento no así de agua (Figura 7a y 7b).



**Fig. 6.** Peso semanal expresado en forma relativa respecto al valor basal en animales sanos, HAP y HAP+PPTN. Valores significativos respecto a la evaluación basal \* $p < 0,05$  mediante Prueba Kruskal-Wallis. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

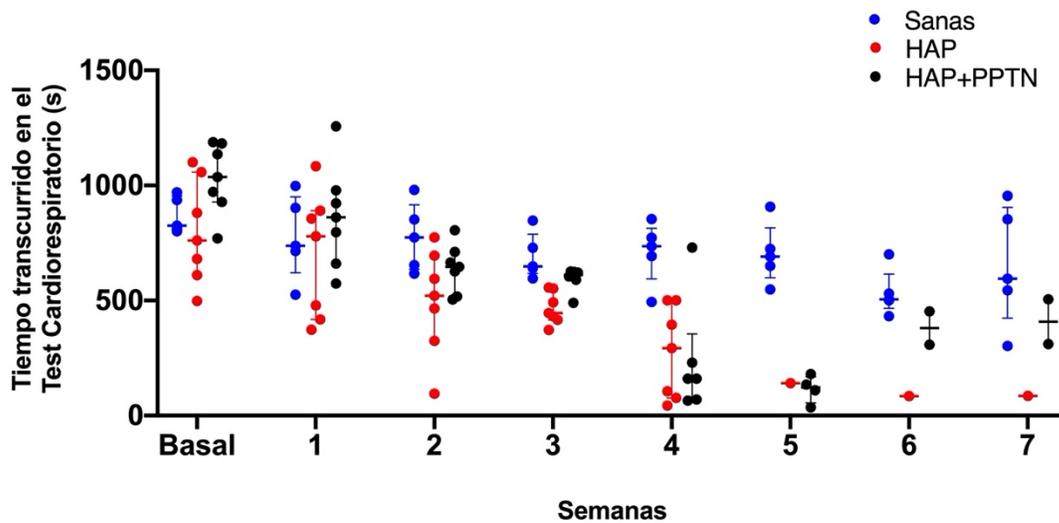


**Fig. 7.** Ingesta semanal de alimento y agua (peso en g) en animales HAP y HAP+PPTN. Datos expresados en mediana (rango intercuartílico).

#### 9.4. Capacidad Cardiorespiratoria (CC).

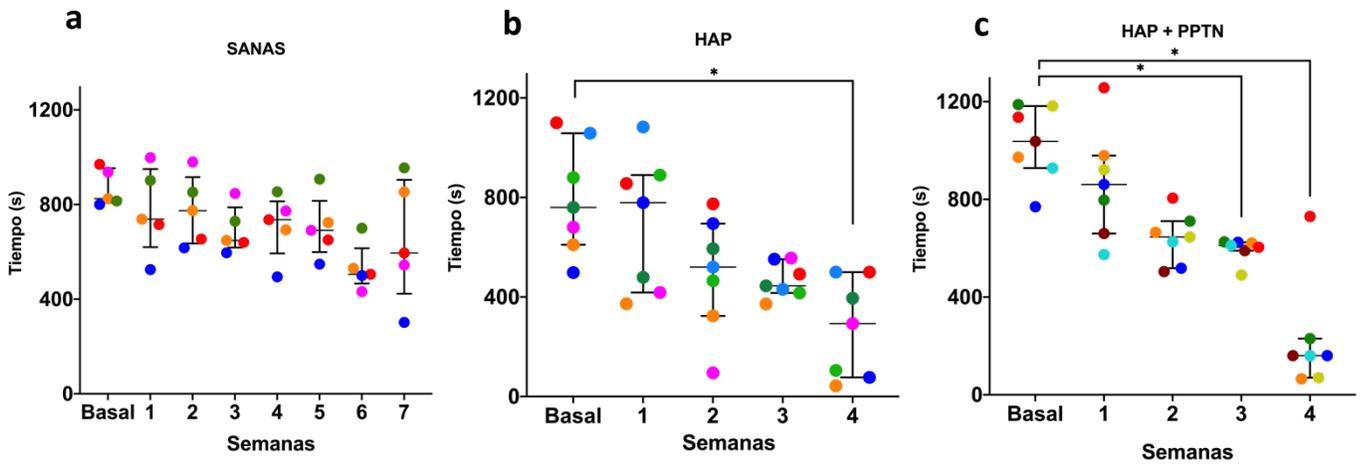
Se sometió a los animales a un proceso de adaptación de 2 semanas de duración, en el cual debían completar 10 minutos a una velocidad constante de 10 m/min en treadmill. Si el animal no continuaba caminando era estimulado con un puff de aire comprimido. La totalidad de animales completó exitosamente el periodo de adaptación y se les administró una inyección de vehículo en el caso de animales Sanos (n=5) o MCT si correspondiera al grupo de estudio HAP (n=7) o HAP+PPTN (n=7) sin embargo, es necesario considerar que los grupos HAP y HAP+PPT mantuvieron el número de animales a la cuarta semana del experimento, lo que permitió la realización de análisis estadísticos, posterior a esa fecha, se presenta pérdida de animales en la medida que avanzaba el estudio asociado a mortalidad.

Los animales de cada grupo fueron sometidos a evaluaciones de CC a través de un test incremental en treadmill, según lo descrito en metodología. Se observa en la figura 8, la progresión de la CC reflejado en el tiempo máximo desarrollando el test hasta la semana 7, debido a la mortalidad de animales consecuencia de la HAP. No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar entre los grupos de animales sanos, HAP y HAP+PPTN por cada una de las semanas, no existiendo variación del tiempo de mantención en el test de CC entre los grupos.



**Fig 8.-** Comportamiento semanal del tiempo de mantención en el Test Cardiorespiratorio en ratas sanas, HAP y HAP+PPTN. No se presentan diferencias significativas entre grupos mediante Test Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ .

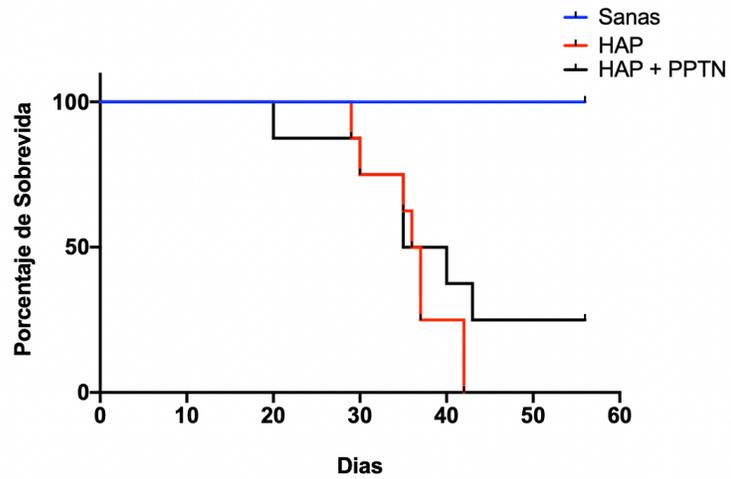
Sin embargo, al hacer una comparación intragrupo del tiempo realizando el test cardiorespiratorio, es posible observar que el grupo HAP presenta una disminución a la semana 4 (293 (77-500)) comparada con el valor basal (760 (610-1058)) (Figura 9b) en cambio, el grupo HAP+PPTN posee una disminución significativa en la semana 3 (611 (590-624)) y semana 4 (160 (70-230)) en relación a la semana basal (1037 (928-1182)), lo cual es posible de observar en la figura 9c. Las pruebas cardiopulmonares fueron realizadas posterior a la cuarta semana, sin embargo no fueron consideradas para en análisis intragrupo dada que la mortalidad asociada a la HAP produce una disminución en el número de pruebas y por consiguiente en la confiabilidad del dato estadístico entregado. Los grupos HAP y HAP+PPT mantuvieron el número de animales a la cuarta semana del experimento, lo que permitió la realización de análisis, posterior a esa fecha, se presenta pérdida de animales asociado a mortalidad.



**Fig. 9.-** Comportamiento semanal del tiempo de mantención en el Test Cardiorespiratorio en ratas sanas, HAP y HAP+PPTN. Diferencias significativas intragrupo mediante Test Friedman;  $p < 0,05$ .

### 9.5. Curva de Sobrevida.

Considerando el posible impacto del tratamiento antipurinérgico específico con PPTN en animales con hipertensión pulmonar, se evaluó el impacto en la sobrevida. El grupo control completó todas las fases del experimento, y el grupo HAP alcanzó una sobrevida de 36,5 y el grupo HAP+PPTN de 37,5 días, sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos ( $p = 0,2908$ ). Al finalizar el experimento, 2 animales siguieron con vida en el grupo de ratas HAP tratadas con PPTN hasta el día 56, como es posible de observar en la figura 10.



**Fig. 10.** Curva Kaplan-Meier. Es posible observar que hasta el final del experimento, un 28,5% de los animales HAP tratados siguieron con vida, sin embargo, no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre grupos HAP y HAP con tratamiento de PPNT intratraqueal.

## 10. DISCUSIÓN

La MCT es un modelo de estudio frecuente para instaurar HAP idiopática de forma preclínica y en nuestra investigación, fue efectivo en instaurar un modelo de hipertensión, basado en parámetros morfológicos y funcionales. El modelo de MCT es el más utilizado en el desarrollo de nuevos fármacos debido a su simplicidad, reproducibilidad, confiabilidad y bajo costo. [Gómez et al. 2012, Novelli et al. 2019]

El modelo de MCT ha contribuido a una mejor comprensión de la remodelación vascular y cambios hemodinámicos en la HAP [Gómez et al. 2012] esto, sumado a la experiencia previa en nuestro laboratorio, que permitió calcular espacio y temporalidades para observar un efecto del tratamiento. De esta forma, el modelo permitió observar los efectos del tratamiento antipurinérgico específico del receptor  $P_2Y_{14}$  en animales con HAP, manifestado en parámetros cardiacos, ecocardiográficos, y funcionales.

Los animales con HAP del estudio, fueron inducidos a través de una dosis única de 60 mg/kg de MCT por vía subcutánea. En este sentido es posible decir que los efectos medidos en los animales son atribuidos a la presencia de sobrecarga pulmonar y no por efectos propios de la MCT en otros tejidos, según lo reportado por otros estudios, donde se recomienda la dosis única para asegurar efectos pulmonares [Kolettis et al., 2007, Gómez-Arroyo et al., 2011, Bueno-Beti et al., 2018]. Al mismo tiempo es importante recordar la importancia del peso de los animales al momento de la administración de monocrotalina, donde se ha reportado que animales con peso menor a 200 g., presentan mayor mortalidad (cerca al 83%) [Porvasnik et al., 2006]. Nuestro estudio utilizó animales entre 200-300 g. lo cual asegura una baja mortalidad atribuida a la administración de monocrotalina (8%) cuando se utilizan dosis entre 40-80 mg/kg [Porvasnik et al., 2006]. De acuerdo a la experiencia mostrada en estudios anteriores, la HAP también presenta cambios en otros tejidos, como signos de inflamación y fibrosis intestinal, también se han reportado activación del sistema renina angiotensina, regulado positivamente en pacientes y en modelos animales de HAP (Hipóxica y MCT) [Oliveira et al. 2006], por tanto, podríamos dar cuenta que cambios en otros tejidos, son esperables tanto en modelos animales como en pacientes y estarían asociados a las características propias de la HAP.

De acuerdo a los resultados de nuestra investigación, podemos decir que efectivamente el modelo de MCT logró una sobrecarga cardiaca derecha a partir del aumento de la resistencia vascular pulmonar propia del HAP. Esta afirmación queda demostrada en los cambios

ecocardiográficos mostrados en los grupos HAP y HAP+PPTN, quienes presentaron una caída en significativa en la variable TacAP, lo cual ya ha sido asociado como criterio pronóstico de la enfermedad [Koskenvuo et al. 2010]. Al mismo tiempo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables asociadas al VI, lo cual da cuenta que nuestro estudio, efectivamente logró replicar la sobrecarga cardiaca derecha, como sucede en la clínica y que se apoya además en los resultados de hipertrofia cardiaca derecha, como respuesta compensatoria al aumento de la resistencia vascular pulmonar, efecto hipertrófico que no se presentó en el VI, reafirmando el modelo de MCT como inductor de HAP.

En relación a la administración de PPTN, el medicamento administrado por vía intratraqueal fue un volumen de 1,5 ml/kg de una solución a 10 $\mu$ M de PPTN. El volumen de dosificación usado para la instilación varía de 1-2 ml/kg. en estudios anteriores [Kobayashi et al., 2016, Senoh et al. 2020]. Volúmenes mayores de 3,5 ml/kg de peso corporal, están asociados a mayor mortalidad en ratas y un menor volumen podría no llegar a la vía aérea profunda [Kobayashi T. et al. 2019]. La velocidad de instilación también es un factor, donde mayores velocidades de instilación están asociadas a mayor distribución intrapulmonar [Kobayashi et al. 2019]. Previo a la realización del procedimiento, se realizó un tiempo de entrenamiento con tinta china, lo cual permitió visualizar la distribución del volumen instilado al interior del pulmón. Un periodo de entrenamiento fue esencial para el correcto manejo del procedimiento. La preparación del medicamento a una concentración de 10 $\mu$ M, se realizó considerando experiencias anteriores donde PPTN logró una disminución estadísticamente significativa en el conteo de neutrófilos inducidos por UDP-Glc en animales sanos en un modelo murino [Sesma et al., 2016].

Sin embargo, los efectos antiinflamatorios de PPTN no son exclusivos del pulmón. Se observó la efectividad de PPTN 1  $\mu$ M para atenuar la respuesta contráctil de arterias coronarias porcinas y restaurar los niveles de AMPc intracelular que fueron disminuidos por la aplicación previa de UDP-glucosa [Abbas et al. 2018].

Posteriormente, se ha demostrado que el daño renal agudo en modelo murinos, presenta un aumento en los niveles de UDP-Glc proveniente de células renales lesionadas [Battistone et al., 2020]. UDP-Glc estimularía a receptores P<sub>2</sub>Y<sub>14</sub> ubicadas en la membrana apical de células intercaladas del túbulo colector con la consecuente producción de interleuquinas proinflamatorias quimioatrayentes y que estimulan el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, lo que contribuye a obstruir la microvasculatura del riñón, lo que perpetúa y agrava

la lesión isquémica [Battistone et al., 2020]. La administración profiláctica diaria de 4,55 mg/kg de PPTN a una concentración de entre 10-20 mM, fue realizada a través de inyección única subcutánea o a través de minibombas osmóticas subcutáneas, dependiendo si el tratamiento se hacía 2, 24 o 48 horas previo a una cirugía de daño por isquemia y reperfusión renal. El tratamiento con PPTN redujo el reclutamiento de neutrófilos y el grado de disfunción renal en el modelo murino [Battistone et al., 2020].

Estas recientes experiencias nos llevan a pensar que nuestro estudio priorizó un criterio conservador en la dosificación del medicamento dada la evidencia hasta la fecha, lo cual pudo influir en los resultados obtenidos. Nuevas experiencias con el uso de PPTN nos permiten visualizar que una concentración mayor del medicamento y otras vías de administración son seguras para los animales, sin embargo, el objetivo de la presente investigación era centrar los efectos del PPTN a nivel pulmonar, por lo cual se decidió considerar la instilación intratraqueal como un método plausible de replicar por sobre otros métodos como la Nebulización, que si bien fue considerada inicialmente, requería validar el método en el laboratorio en desmedro de los tiempos asignados para la investigación, pero que no se descarta como método menos invasivo para la administración del medicamento.

La ecocardiografía es un procedimiento de imagen que permite visualizar de forma no invasiva la progresión de los síntomas en la HAP cómo el aumento de tamaño del VD o otros parámetros relacionados a la sobrecarga ventricular [Zhu et al. 2019].

Se consideró describir el comportamiento de variables ecocardiográficas durante el experimento, como una forma de probar objetivamente la consolidación del modelo experimental de HAP inducido por monocrotalina. Para cumplir con este objetivo, se decidió incorporar una evaluación semanal de variables ecocardiográficas, dada la limitación que implica la realización de cateterismo cardiaco derecho, considerado un procedimiento invasivo. El cateterismo cardiaco derecho, al igual que el procedimiento ecocardiográfico, requiere uso de anestesia, sin embargo el cateterismo involucra mayor tiempo, lo que afectaría a los animales en la medida que progresa la HAP [Koskenvuo et al. 2010, Guerra et al. 2011]. Para garantizar el correcto proceder de la Ecocardiografía, se consideró la temperatura de la plataforma animal (37°C), dada que la inmovilidad asociada a la anestesia, hace que la termoregulación del animal se vea afectada [Zhu et al. 2019]. El control en salida del isoflurano es importante, dado que mantiene la frecuencia cardíaca constante durante la adquisición de datos y un cambio abrupto en el flujo, puede interrumpir el procedimiento o

incluso generar una bradicardia en el caso que los animales hayan progresado en la enfermedad, sin embargo, los rangos de frecuencia se mantienen sobre 300 latidos por minuto [Zhu et al. 2019].

Se evaluaron todos los animales que participaron en el estudio, sin embargo la mortalidad asociada a la progresión de la enfermedad, impidió considerar en el análisis los valores de ecocardiografía hasta el final del experimento, debido a que la disminución de datos entrega estadísticas poco confiables, por lo que se decide analizar hasta la cuarta semana, momento en el cual no se producían pérdidas de animales en los grupos (tabla 4).

Fueron evaluadas 13 variables de las cuales 7 corresponden a la función del VI. Como se mencionó previamente, las variables asociadas al VI no presentaron diferencias significativas, concordante con que la HAP afecta clínicamente al VD y no al VI en su función. De las variables que corresponden al VD, la  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $V_{med}$ ,  $m\acute{a}xG$  y  $meanP$ , presentaron una disminución significativa en la evaluación a la cuarta semana (Tabla 4), respecto a la evaluación basal, tanto para el grupo HAP y HAP tratado con PPTN. Se demuestra por tanto cambios en la función del VD a la cuarta semana de realizado el experimento (Tabla 4) y donde el tratamiento con PPTN no generó un cambio significativo, de todas formas, la literatura menciona que ningún cambio en los valores de estas variables, tendría una asociación con la progresión de la HAP [Koskenvuo et al. 2010]. Una situación distinta, sucede con la variable TacAP, cuyos valores poseen sensibilidad y especificidad para considerarlo como criterio diagnóstico de HAP, cuando el valor se encuentra  $\leq 19$  ms [Koskenvuo et al. 2010; Spyropoulos et al. 2020]. Considerando el análisis estadístico, es posible mencionar que el grupo HAP tuvo una disminución significativa en el TacAP a la cuarta semana, dando cuenta de la presencia de sobrecarga ventricular derecha, producto del aumento en la resistencia vascular pulmonar. Sin embargo, en el grupo HAP+PPTN no se encuentra una caída significativa del TacAP a la cuarta semana (Tabla 4), lo cual también es posible de apreciar en el seguimiento semana a semana del TacAP (Figura 5c), sin embargo, es posible observar una mayor variabilidad de los animales del grupo HAP+PPTN en la semana 4, lo cual posiblemente haya influido en el resultado. En la semana 5 no se presentaron diferencias estadísticamente significativas tanto para el grupo HAP y HAP+PPTN en relación a la evaluación basal, sin embargo estos resultados deben ser vistos con cautela, dada la disminución del número de animales. Con estos antecedentes, es posible mencionar que la administración de PPTN pudo generar un atraso en la progresión del HAP en los animales tratados por Instilación intratraqueal, lo cual desde el punto de vista clínico puede tener implicancias importantes, cuando se considera a la HAP como una enfermedad progresiva y

de diagnóstico tardío [Weinberger et al., 2014, Churg et al., 2018]. La aplicación de PPTN de forma temprana, podría tener un afán preventivo, pero desde el punto de vista clínico es poco factible, dadas las características diversas de los síntomas que no permiten dar con la enfermedad hasta que ya está instalada. Sin embargo si PPTN administrado en HAP podría jugar un rol importante en detener procesos de remodelación vascular y resistencia vascular, como sucedió en otros tejidos como el Riñón [Battistone et al., 2020] y como sucedió en nuestro estudio al atrasar la progresión de la enfermedad.

En comparación con los estudios ecocardiográficos anteriores, nuestros datos ecocardiográficos son consistentes en la disminución del tiempo de aceleración de arteria pulmonar, progresiva en la enfermedad (Novelli et al. 2019, Zhu et al. 2019). Se plantea que el TacAP es un parámetro de alta especificidad que permite excluir a los animales de un experimento, debido al fracaso en la inducción de la enfermedad y por otro lado, presenta alta sensibilidad para detectar la enfermedad establecida antes del tratamiento [Koskenvuo et al. 2010]. Este método nos entregó ventajas frente al cateterismo cardíaco y permitió probar la correcta consolidación de la enfermedad con el modelo de HAP inducido por MCT.

El Índice de Fulton (IF) permite evaluar la hipertrofia del VD comparando los pesos entre la pared libre del VD y el VI más las paredes septales. Si bien, junto al cateterismo cardíaco derecho y la histopatología cardíaca y pulmonar, permiten caracterizar el modelo animal de HAP, todos son procedimientos terminales que no permiten monitoreo longitudinal y tienen un costo prohibitivo para establecer la eficacia a largo plazo de la intervención probada [Spyropoulos et al. 2020]. Sin embargo, es útil para demostrar la sobrecarga cardíaca, concordante al aumento de la resistencia pulmonar.

En nuestro estudio, se observó que ratas controles presentaron índices de Fulton en los rangos de normalidad similar a datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio [Barros et al. 2018]. Los grupos HAP y HAP tratadas con PPTN vía instilación intratraqueal, alcanzaron valores significativamente mayores en el peso de la pared libre del VD, lo que nos permite comprobar *post mortem* la inducción de HAP por MCT, concordante con un aumento de la resistencia pulmonar y que en instancias más avanzadas de la enfermedad, va en desmedro de la morfología del VI, demostrado en una disminución del peso del VI más septum de ratas HAP tratadas con PPTN (Tabla 3). Spyropoulos et al. 2020, establece un valor de referencia para el  $IF \geq 0,34$  nos permite establecer claramente la presencia de hipertrofia cardíaca

derecha, lo cual sería consecuente con la presencia de sobrecarga ventricular derecha en el modelo HAP inducido por MCT.

Una de las evaluaciones propuestas es la normalización del peso del VD en relación al peso total del animal. Reportes anteriores han mostrado que la medida VD/PC (Ventrículo Derecho/Peso Corporal) posee relación con el PAPm medida por cateterismo cardiaco derecho, sin embargo el Índice de Fulton tiene validez, confiabilidad y límite de corte establecido en la HAP a diferencia del VD/PC [Spyropoulos et al. 2020], además, considerar el peso del animal como una forma de normalizar el peso del VD, podría llevarnos a sobreestimar es verdadero comportamiento del VD en la HAP, dado el menor aumento de peso en animales hipertensos respecto de los sanos.

De esta forma, es posible demostrar la presencia de hipertrofia del VD concordante sobrecarga ventricular y aumento de la presión de arteria pulmonar al momento de la eutanasia. Desde el punto de vista estadístico, no existieron diferencias entre grupos HAP y HAP tratadas con PPTN, dando cuenta que ambos grupos estaban en presencia de sobrecarga cardiaca derecha y que el inhibidor específico para el receptor  $P_2Y_{14}$  no generó cambios en este ámbito.

Es necesario mencionar que las restricciones temporales asociadas a la contingencia sanitaria impactaron negativamente en el desarrollo programado de la investigación, lo cual obligó a hacer modificaciones en el transcurso u optar por métodos que requirieran un menor tiempo en su desarrollo. En este sentido, la instilación intratraqueal es un método altamente invasivo en este modelo animal, sin embargo fue elegido frente a otros métodos que necesitaban validación y instalación en nuestro laboratorio. De todas formas, la instilación intratraqueal es confiable en la entrega de medicamento y otras sustancias aunque la aplicación de anestesia debe ser criteriosa y considerar la condición de progresión de la enfermedad en cada uno de los animales. El contexto sanitario actual asociado a la pandemia también influyó para prescindir del grupo HAP + Vehículo de PPTN lo cual nos limitó en analizar el impacto que podría generar la instilación como procedimiento en animales con HAP. De todas formas, fue posible realizar todas las evaluaciones propuestas en otros aspectos como indicadores de la condición cardiorespiratoria.

En humanos, la capacidad cardiorespiratoria de los pacientes, posee una alta relevancia pronóstica en diversas formas de HAP, incluso un cambio relevante como respuesta a una intervención farmacológica, ha sido un instrumento de medición establecido para evaluar el

éxito de la terapia durante décadas, lo cual ha llevado a la aplicación de Test submáximos como el Test de Marcha de 6 minutos para obtener una visión del estado físico del paciente [Greifswald et al. 2020]. De hecho, un bajo rendimiento en el Test, podría indicar una reducción en la esperanza de vida, así como un alto rendimiento en el Test se asocia a una baja mortalidad dentro de un año [Greifswald et al. 2020].

En nuestro caso, destacamos la factibilidad técnica del test en animales, considerando muy importante la presencia de un periodo de adaptación, dado que permite que el desempeño del animal se encuentre libre de factores asociados al stress. El periodo de adaptación no debe ser visto como un entrenamiento, dado que no cumple características básicas como la especificidad, la sobrecarga paulatina y la temporalidad. Una vez terminado el periodo de adaptación para cada animal, es posible efectuar el test cardiorespiratorio en los animales. Las ratas con HAP van disminuyendo su capacidad cardiorrespiratoria a medida que va evolucionado la enfermedad y se hace estadísticamente significativa a partir de la cuarta semana posterior a la inyección de MCT (Figura 9b). Lo anterior es concordante con que la HAP es una patología progresiva, situación que también se presenta en los animales HAP tratados con PPTN, quienes presentan una disminución del tiempo realizando el test cardiorespiratorio desde la tercera y cuarta. Si consideramos solamente la tercera semana, la mediana del grupo HAP (Figura 9b) es menor que el grupo HAP tratado con PPTN (Figura 9c), sin embargo en el grupo HAP no alcanza a ser estadísticamente significativo en relación al valor basal (Figura 9b). Posiblemente este comportamiento se atribuya a una mayor variabilidad de los datos, que no son lo suficientemente homogéneos para ser significativos a la prueba estadística para el grupo HAP (Figura 8).

Las curvas de peso en ratas controles son similares a experiencias anteriores en el laboratorio y son concordantes con curvas de peso en cohortes de animales y valores teóricos a las semana 14-15 (Brower et al. 2015). Los animales sanos, tienen un aumento de peso significativo desde la tercera semana en adelante, sin embargo el grupo HAP a pesar de tener un aumento de peso significativo en la tercera y cuarta semana posterior a la inyección de MCT, no alcanza los valores del grupo de animales sanos (Figura 6). En el caso de los animales HAP tratados con PPTN por instilación intratraqueal, no se aprecian diferencias significativas de peso desde la inyección de MCT, por tanto no suben de peso como esperaría que suceda en animales sanos (Figura 6). Sin embargo es interesante observar que tanto el grupo HAP y el grupo HAP tratado con PPTN no suben de peso desde la primera semana posterior a la inyección de MCT. Este último dato es importante si al mismo tiempo

observamos los gráficos de ingesta de agua y alimento de los grupos HAP y HAP tratados con PPT (Figura 7a y 7b). Es posible observar una disminución en la ingesta de alimento desde la segunda semana en adelante, pero las ratas no suben de peso desde la primera semana. Esto nos lleva a pensar que la inducción de HAP por monocrotalina, genera inicialmente una baja de peso en los animales que reciben MCT, manifestado en el peso del animal desde la primera semana. Posteriormente como signo más tardío se suma la disminución de la ingesta alimentaria, lo acelera el proceso de deterioro del animal. El tratamiento con el bloqueador específico del receptor  $P_2Y_{14}$  por vía instilación intratraqueal, no mostró un efecto en la recuperación del peso de los animales tratados, no mostrando diferencias con el grupo HAP sin tratamiento.

Las ratas sanas alcanzaron una sobrevida del 100% al final de estudio, sobrellevando los procedimientos de evaluación cardiorrespiratoria y ecocardiografía de forma satisfactoria. Considerando las intervenciones realizadas en los animales, la primera que correspondía a la inducción de la HAP por MCT y luego las instilaciones de PPTN en las ratas HAP tratadas, se realizó un análisis de sobrevida para los 3 grupos. La sobrevida del grupo HAP correspondió a 36,5 días mientras que en el grupo HAP tratadas con PPTN la sobrevida aumentó a 37,5 días, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas, como se observa en la figura 8. De todas formas, creemos importante considerar que dentro del grupo de animales tratados con PPTN, el 29% de los animales ( $n= 2$ ) sobrevivieron por sobre los 37,5 días, llegando a 56 días que era el límite de duración del estudio y que hace posible un rango de efectividad del medicamento que debe ser estudiado posteriormente, dado que dichos animales presentaron un índice de Fulton sobre 0,34 [Spyropoulos et al. 2020], coincidente con sobrecarga cardiaca derecha y con que uno de estos animales no haya presentado una disminución del TacAP a la cuarta semana y presentara mayor rendimiento en el test de capacidad cardiorrespiratoria. El otro animal con mayor sobrevida no tuvo un mejor comportamiento en las variables estudiadas, lo que nos lleva a pensar que son necesarios más estudios para tener conclusiones al respecto.

La sobrevida en nuestro estudio, fue mayor a otras experiencias anteriores en nuestro laboratorio, quien presentó una sobrevida de 28 días para el grupo HAP y 36 días para el grupo tratado con suramina. (Barros et al. 2018). Creemos podría ser posible, dado que en nuestra investigación, los animales solo fueron evaluados una vez a la semana, lo que permitía que se mantuvieran sin agentes que pudieran perturbarlas, a diferencia de otros

estudios, en los cuales, se hizo mayor cantidad de procedimientos semanales (Barros et al. 2018).

Considerando el atraso en la progresión de la HAP observada en el grupo de ratas HAP tratada con PPTN en nuestro estudio, se hace necesario buscar el impacto del bloqueo específico del receptor  $P_2Y_{14}$  en variables como la infiltración de neutrófilos perivasculares pulmonares, cambios histológicos, contracción del músculo liso en venas pulmonares pequeñas y sus posibles efectos clínicos en otros sistemas. Considerar el uso de PPTN como tratamiento en estudios preclínicos se visualiza como prometedor, considerando experiencias de otros autores, quienes vieron efectos antiinflamatorios relevantes y mantención de la función renal [Battistone et al., 2020].

Una forma para lograr especificidad del sistema pulmonar es a través de la terapia inhalada, lo cual se propone como un método menos invasivo que la instilación y que permite una mayor concentración de medicamento como una acción terapéutica posible. Aumentar la dosis de PPTN dada la nueva evidencia, nos permite asegurar mayor presencia del medicamento y mayor efectividad del bloqueo del receptor  $P_2Y_{14}$ , lo cual podría verse representado en variables estudiadas en la presente investigación.

Un posible método de estudio, se puede lograr a través de un modelo knock-out de  $P_2Y_{14}$ , la cual ya ha sido probada y asegura la supervivencia de los animales [Battistone et al., 2020]. Los distintos métodos de investigación nos permiten avanzar hacia futuros ensayos clínicos en este campo de la investigación.

## 11. CONCLUSIONES

Es posible evaluar la función cardíaca por medio de Ecocardiografía en población de ratas sanas y con HAP, donde la variable tiempo de aceleración de arteria pulmonar disminuyó significativamente en animales HAP, pero no en animales HAP tratados con PPTN, resultado asociado a una alta variabilidad en los parámetros de los animales. Se infiere que el tratamiento con PPTN logró un atraso en la progresión de la enfermedad en ratas. La variable Tiempo de Aceleración de Arteria Pulmonar permite distinguir a animales enfermos de los sanos y evaluar la progresión de la enfermedad de una forma no invasiva, algo esencial en estados de deterioro físico producto del avance de la HAP.

En nuestro estudio se comprueba que el tratamiento antipurinérgico específico para el receptor P2Y<sub>14</sub> administrado a través de instilación intratraqueal, no mejora la función cardiorespiratoria ni la supervivencia en un modelo de ratas con HAP, sin embargo queda por comprobar otros métodos de administración y dosis, al mismo tiempo de determinar el impacto dentro de los parámetros inflamatorios de las ratas.

## 12. REFERENCIAS

1. Abbas, Z. S. B., Latif, M. L., Dovlatova, N., Fox, S. C., Heptinstall, S., Dunn, W. R., & Ralevic, V. (2018). UDP-sugars activate P2Y14 receptors to mediate vasoconstriction of the porcine coronary artery. *Vascular Pharmacology*, 103–105(April 2017), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.12.063>
2. Barros MJ, Henriquez M. Efectos del tratamiento con suramina en la capacidad para realizar ejercicio y contractibilidad de venas intrapulmonares pequeñas en modelo animal de hipertensión pulmonar. Universidad de Chile. 2018.
3. Battistone, M. A., Mendelsohn, A. C., Spallanzani, R. G., Allegretti, A. S., Liberman, R. N., Sesma, J., Breton, S. (2020). Proinflammatory P2Y14 receptor inhibition protects against ischemic acute kidney injury in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3734–3749. <https://doi.org/10.1172/JCI134791>
4. Bentley, D. J., Newell, J., & Bishop, D. (2007). Incremental exercise test design and analysis: Implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Medicine*, 37(7), 575–586. <https://doi.org/10.2165/00007256-200737070-00002>
5. Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M., & Koya, V. (2015). Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. *Laboratory Animal Research*, 31(4), 166. <https://doi.org/10.5625/lar.2015.31.4.166>
6. Bueno-Beti, C., Sassi, Y., Hajjar, R. J., & Hadri, L. (2018). Pulmonary Artery Hypertension Model in Rats by Monocrotaline Administration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1816, 233–241. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_18)
7. Burnstock, G., & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology*, 16(5), 433–440. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(85\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(85)90001-1)
8. Burnstock, Geoffrey. (2017). Introduction to the special issue on purinergic receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1051, 1–6. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2017\\_12](https://doi.org/10.1007/5584_2017_12)
9. Burnstock, Geoffrey, Arnett, T. R., & Orriss, I. R. (2013). Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signalling*, 9(4), 541–572. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9381-4>
10. Burnstock, Geoffrey, & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*, 240(SPEC.ISS.), 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)
11. Carter, R. L., Fricks, I. P., Barrett, M. O., Burianek, L. E., Zhou, Y., Ko, H., Harden, T. K. (2009). Quantification of Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity reveals that UDP is a potent agonist of the human P2Y14 receptor. *Molecular Pharmacology*, 76(6), 1341–1348. <https://doi.org/10.1124/mol.109.058578>
12. Casas, M., Buvinic, S., & Jaimovich, E. (2014). ATP signaling in skeletal muscle: From fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 42(3), 110–116. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
13. Chen, F., Wang, H., Zhao, J., Yan, J., Meng, H., Zhan, H., Yuan, L. (2019). Grape seed proanthocyanidin inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via attenuating inflammation: in vivo and in vitro studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 67, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.013>
14. Churg, A., & Wright, J. L. (2017). Pulmonary Hypertension. *Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach A Volume in the Pattern Recognition Series (Third Edition)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44284-8.00012-0>

15. Conroy, S., Kindon, N., Kellam, B., & Stocks, M. J. (2016). Drug-like Antagonists of P2Y Receptors - From Lead Identification to Drug Development. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(22), 9981–10005. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01972>
16. Cowan, K. N., Heilbut, A., Humpl, T., Lam, C., Ito, S., & Rabinovitch, M. (2000). Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nature Medicine*, 6(6), 698–702. <https://doi.org/10.1038/76282>
17. Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Hoepfer, M. (2015). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 46(4), 903–975. <https://doi.org/10.1183/13993003.01032-2015>
18. Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F., & Bogaard, H. J. (2012). The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(4), 363–369. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>
19. Greifswald, U., Carl, U., Carus, G., & Pneumologie, B. (2020). Aktuelle Definition und Diagnostik der pulmonalen Hypertonie Current Aspects of Definition and Diagnosis of Pulmonary Hypertension Die neue Definition der pulmonalen.
20. Guerra Ramos, F. J. (2011). Papel de la ecocardiografía ante la sospecha de hipertensión pulmonar. *Archivos de Bronconeumología*, 47(SUPPL. 7), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(11\)70053-9](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(11)70053-9)
21. Harden, T. K., Sesma, J. I., Fricks, I. P., & Lazarowski, E. R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y14 receptor. *Acta Physiologica*, 199(2), 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02116.x>
22. Haydon, P. (2012). Purinergic Signaling. *Basic Neurochemistry*, 377–389. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00019-5>
23. Hasegawa-Baba, Y., Kubota, H., Takata, A., & Miyagawa, M. (2014). Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat. *Journal of toxicologic pathology*, 27(3-4), 197–204. <https://doi.org/10.1293/tox.2014-0022>
24. Jeffery, T. K., & Wanstall, J. C. (2001). Pulmonary vascular remodeling: A target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacology and Therapeutics*, 92(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00157-7)
25. Kanagy, N. L., & Watts, S. W. (2007). Vascular smooth muscle contraction. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference (Fourth Edition)*. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60331-9>
26. Kelava, T., Čavar, I., (2011). Biological actions of drug solvents. *Periodicum Biologorum*, 113, 311–320.
27. Khromov, A., Choudhury, N., Stevenson, A. S., Somiyō, A. V., & Eto, M. (2009). Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca<sup>2+</sup> sensitization force of smooth muscle contraction. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21569–21579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019729>
28. Klaver, D., & Thurnher, M. (2021). Control of Macrophage Inflammation by P2Y Purinergic Receptors. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051098>
29. Kobayashi, T., Oshima, Y., Tsubokura, Y., Hashizume, N., Ajimi, S., Kayashima, T., Imatanaka, N. (2016). Effects of dose volume and delivery device on bronchoalveolar lavage parameters of intratracheally administered nano-sized TiO<sub>2</sub> in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.08.018>
30. Kobayashi T. et al. (2019) Standardization of Intratracheal Instillation Study of Manufactured Nanomaterials. In: Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. (eds) *In Vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*. Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8433-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8433-2_6)

31. Kolettis, T., Vlahos, A. P., Louka, M., Hatzistergos, K. E., Baltogiannis, G. G., Agelaki, M. M., Malamou-Mitsi, V. (2007). Characterisation of a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Hellenic Journal of Cardiology*, 48(4), 206–210.
32. Koskenvuo, J. W., Mirsky, R., Zhang, Y., Angeli, F. S., Jahn, S., Alastalo, T. P., Yeghiazarians, Y. (2010). A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. *International Journal of Cardiovascular Imaging*, 26(5), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s10554-010-9596-1>
33. Kroeze, W. K., Sheffler, D. J., & Roth, B. L. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of Cell Science*, 116(24), 4867–4869. <https://doi.org/10.1242/jcs.00902>
34. Khromov, A., Choudhury, N., Stevenson, A. S., Somlyo, A. V., & Eto, M. (2009). Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca<sup>2+</sup> sensitization force of smooth muscle contraction. *The Journal of biological chemistry*, 284(32), 21569–21579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019729>
35. Lazarowski, E. R., & Harden, T. K. (2015). UDP-sugars as extracellular signaling molecules: Cellular and physiologic consequences of P2Y<sub>14</sub> receptor activation. *Molecular Pharmacology*, 88(1), 151–160. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098756>
36. Le, Berg, N. K., Harting, M. T., Li, X., Eltzschig, H. K., & Yuan, X. (2019). Purinergic signaling in pulmonary inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10 (JULY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01633>
37. Leggio, M., Fusco, A., Armeni, M., D'Emidio, S., Severi, P., Calvaruso, S., Mazza, A. (2018). Pulmonary hypertension and exercise training: a synopsis on the more recent evidences. *Annals of Medicine*, 50(3), 226–233. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1432887>
38. Liu, Z., & Khalil, R. A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 153 (February), 91–122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>
39. Ma, J., Wei, K., Liu, J., Tang, K., Zhang, H., Zhu, L., Huang, B. (2020). Glycogen metabolism regulates macrophage-mediated acute inflammatory responses. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15636-8>
40. Meriney, S. D., Fanselow, E. (2019). Metabotropic g-protein-coupled receptors and their cytoplasmic signaling pathways. *Synaptic Transmission*, 245–273. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815320-8.00012-0>
41. Moore, D. J., Murdock, P. R., Watson, J. M., Faull, R. L. M., Waldvogel, H. J., Szekeres, P. G., Emson, P. C. (2003). GPR105, a novel Gi/o-coupled UDP-glucose receptor expressed on brain glia and peripheral immune cells, is regulated by immunologic challenge: Possible role in neuroimmune function. *Molecular Brain Research*, 118(1–2), 10–23. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00330-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00330-9)
42. Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *The Veterinary Record*, 116(16), 431–436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
43. Müller, T., Bayer, H., Myrtek, D., Ferrari, D., Sorichter, S., Ziegenhagen, M. W., Idzko, M. (2005). The P2Y<sub>14</sub> receptor of airway epithelial cells coupling to intracellular Ca<sup>2+</sup> and IL-8 secretion. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(6), 601–609. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0181OC>
44. Novelli, D., Fumagalli, F., Staszewsky, L., Ristagno, G., Olivari, D., Masson, S., ... Latini, R. (2019). Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: Time-course of injury and comparative evaluation of macitentan and Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, 865, 172777. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172777>

45. Oliveira, A. C., Richards, E. M., & Raizada, M. K. (2020). Pulmonary hypertension: Pathophysiology beyond the lung. *Pharmacological Research*, 151, 104518. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104518>
46. Orellana C. Henriquez M. Comparación de la respuesta contráctil de venas intrapulmonares pequeñas a uridina difosfato entre ratas con hipertensión pulmonar y ratas sanas. Universidad de Chile. 2018.
47. Paolillo, S., Farina, S., Bussotti, M., Iorio, A., Filardi, P. P., Piepoli, M. F., & Agostoni, P. (2012). Exercise testing in the clinical management of patients affected by pulmonary arterial hypertension. *European Journal of Preventive Cardiology*, 19(5), 960–971. <https://doi.org/10.1177/1741826711426635>
48. Pietra, G. G. (1994). Histopathology of primary pulmonary hypertension. *Chest*, 105(2 SUPPL.), 2S-6S. [https://doi.org/10.1378/chest.105.2\\_Supplement.2S](https://doi.org/10.1378/chest.105.2_Supplement.2S)
49. Porvasnik, S. L., Embury, J. E., Byrne, B. J., & Spencer, C. T. (2006). Dose Response Relationship in a Monocrotaline Rat Model of Pulmonary Hypertension. *The FASEB Journal*, 20(5), 9–10. <https://doi.org/10.1096/fasebj.20.5.a1186>
50. Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., & Nicolls, M. R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, 115(1), 165–175. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
51. Rawshani A. (2020). Clinical Echocardiography – ECG & ECHO [Versión web]. ECG & Echocardiography Education. <https://ecgwaves.com/>
52. Ryan, J. J., Huston, J., Kutty, S., Hatton, N. D., Bowman, L., Tian, L., Archer, S. L. (2015). Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 31(4), 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.023>
53. Sadeghpour, A., & Alizadehasl, A. (2022). Chapter 5 - Echocardiography. In M. Maleki, A. Alizadehasl, & M. Haghjoo (Eds.), *Practical Cardiology (Second Edition)* (Second Edition, pp. 67–110). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-80915-3.00008-9>
54. Sakuma, M., Toyoda, S., Inoue, T., & Node, K. (2019). Inflammation in pulmonary artery hypertension. *Vascular Pharmacology*, 118–119(February), 118–120. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.05.002>
55. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R., & Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 8(8), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>
56. Schober, A. (2008). Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 1950–1959. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161224>
57. Schultze, A. E., Wagner, J. G., White, S. M., & Roth, R. A. (1991). Early indications of monocrotaline pyrrole-induced lung injury in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 109(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(91\)90189-L](https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90189-L)
58. Scrivens, M., & Dickenson, J. M. (2006). Functional expression of the P2Y14 receptor in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, 543(1–3), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.037>
59. Senoh, H., Kano, H., Suzuki, M., Fukushima, S., Oshima, Y., Kobayashi, T., ... Takeshita, J. ichi. (2020). Inter-laboratory comparison of pulmonary lesions induced by intratracheal instillation of NiO nanoparticle in rats: Histopathological examination results. *Journal of Occupational Health*, 62(1), 1–5. <https://doi.org/10.1002/1348-9585.12117>
60. Sesma, J. I., Kreda, S. M., Steinckwich-Besancon, N., Dang, H., García-Mata, R., Kendall Harden, T., Lazarowski, E. R. (2012). The UDP-sugar-sensing P2Y14 receptor promotes Rho-mediated signaling and chemotaxis in human neutrophils. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 303(5), 490–498. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00138.2012>

61. Sesma, J. I., Weitzer, C. D., Livraghi-Butrico, A., Dang, H., Donaldson, S., Alexis, N. E., Lazarowski, E. R. (2016). UDP-glucose promotes neutrophil recruitment in the lung. *Purinergic Signalling*, 12(4), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9524-5>
62. Shubat, P. J., Hubbard, A. K., & Huxtable, R. J. (1989). Dose-response relationship in intoxication by the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 28(4), 445–460. <https://doi.org/10.1080/15287398909531363>
63. Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
64. Soon, E., Holmes, A. M., Treacy, C. M., Doughty, N. J., Southgate, L., MacHado, R. D., ... Morrell, N. W. (2010). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 122(9), 920–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>
65. Spyropoulos, F., Vitali, S. H., Touma, M., Rose, C. D., Petty, C. R., Levy, P., Christou, H. (2020). Echocardiographic markers of pulmonary hemodynamics and right ventricular hypertrophy in rat models of pulmonary hypertension The first two authors contributed equally to this manuscript. *Pulmonary Circulation*, 10(2). <https://doi.org/10.1177/2045894020910976>
66. Stacher, E., Graham, B. B., Hunt, J. M., Gandjeva, A., Groshong, S. D., McLaughlin, V. V., Tuder, R. M. (2012). Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(3), 261–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0164OC>
67. Steiner, M. K., Syrkina, O. L., Kolliputi, N., Mark, E. J., Hales, C. A., & Waxman, A. B. (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 104(2), 236–244. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182014>
68. Thompson, A. A. R., & Lawrie, A. (2017). Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends in Molecular Medicine*, 23(1), 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.11.005>
69. Wang, Z., Schreier, D. A., Hacker, T. A., & Chesler, N. C. (2013). Progressive right ventricular functional and structural changes in a mouse model of pulmonary arterial hypertension. *Physiological Reports*, 1(7), 1–11. <https://doi.org/10.1002/phy2.184>
70. Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
71. Weinberger, S. E., Cockrill, B. A., & Mandel, J. (2014). 14 - Pulmonary Hypertension. In S. E. Weinberger, B. A. Cockrill, & J. Mandel (Eds.), *Principles of Pulmonary Medicine (Sixth Edition)* (Sixth Edition, pp. 189–200). Philadelphia: W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2532-8.00014-1>
72. Wilson, D. W., Segall, H. J., Pan, L. C., Lamé, M. W., Estep, J. E., & Morin, D. (1992). Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 22(5–6), 307–325. <https://doi.org/10.3109/10408449209146311>
73. Yaghi, S., Novikov, A., & Trandafirescu, T. (2020). Clinical update on pulmonary hypertension. *Journal of Investigative Medicine*, 68(4), 821–827. <https://doi.org/10.1136/jim-2020-001291>
74. Zerneck, A., & Weber, C. (2005). Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Research in Cardiology*, 100(2), 93–101. <https://doi.org/10.1007/s00395-005-0511-6>
75. Zerpa, D. D. P., Fernández, A., Estigarribia, J., Kuster, F., Parma, G., & Florio, L. (2019). Estimación de la presión arterial pulmonar mediante ecocardiografía. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 34(3), 270–283. <https://doi.org/10.29277/cardio.34.3.11>
76. Zhu, Z., Godana, D., Li, A., Rodriguez, B., Gu, C., Tang, H., Chen, J. (2019). Echocardiographic assessment of right ventricular function in experimental pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*, 9(2).

