



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Nombre de la Tesis

**Efecto de agonistas de receptores dopaminérgicos en la
respuesta vascular de la arteria pulmonar de ratas
con hipertensión pulmonar**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Luis Manuel de Jesús Vásquez

Codirectores

Dra. María de Jesús Gómez Villalobos

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax. a 29 de Enero de 2020



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Nombre de la Tesis
**Efecto de agonistas de receptores dopaminérgicos en la
respuesta vascular de la arteria pulmonar de ratas
con Hipertensión Pulmonar**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Luis Manuel de Jesús Vásquez

Comité Tutorial

Dra. María de Jesús Gómez Villalobos

Dr. Francisco Castelán

Dra. Estela Cuevas

Dr. Julio Morales Medina

Tlaxcala, Tlax. a 29 de Enero de 2020

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Investigación cardiovascular del Instituto de Fisiología de la BUAP en colaboración con el laboratorio del Dr. Francisco Castelán del CTBC de la UATx.



Beca CONACYT: 440983

El Doctorado en Ciencias Biológicas pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACyT).

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Luis Manuel De Jesús Vásquez** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto de agonistas de receptores dopaminérgicos en la respuesta vascular de la arteria pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., ENERO 23 DE 2020



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



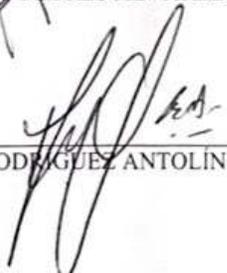
DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA



DR. GONZALO FLORES ÁLVAREZ



DR. JOSÉ GUSTAVO LÓPEZ Y LÓPEZ



DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Agradecimientos especiales

Al Posgrado del CTBC, UATx

Al comité tutorial

Dra. María de Jesús Gómez Villalobos

Dr. Francisco Castelán

Dra. Estela Cuevas

Dr. Julio Morales Medina

Agradecimientos a título personal

Terminar una tesis de doctorado es la culminación de largo tiempo de trabajo, estudio y esfuerzo. Sería muy difícil lograrlo si no es con el apoyo y estímulo de muchas personas.

A la Dra. María de Jesús Gómez Villalobos directora de tesis por confiar en este proyecto, su paciencia, dedicación y buenos consejos siempre.

Al Dr. Francisco Castelán por sus buenos comentarios y apoyo para realizar esta tesis.

Continuando con los agradecimientos, y sin distinguir orillas, -pues están en mi corazón y son mi vida- quiero agradecer profundamente a mi esposa, la Dra. María de Guadalupe Muñoz Arenas y a mis hijas Isabel Fernanda y Luisa Victoria de Jesús Muñoz. Me brindaron su apoyo, me comprendieron, tuvieron tolerancia e infinita paciencia y cedieron su tiempo para permitir así llevar adelante un proyecto que pasó de ser una meta personal a otro emprendimiento más de familia. A ellas, mi eterno amor y gratitud.

Además, un agradecimiento y un reconocimiento especial a quienes han fomentado en todos sus hijos el interés por salir adelante: mis padres.

Un agradecimiento a mis suegros, en especial a mi suegra Josefina Arenas Salazar por su gran apoyo y ánimos para terminar el doctorado.

A mis hermanitas (o): Fabiola, Ligia, María José y Adán por sus buenas vibras.

A mis queridas (o) sobrinas (o): Reginita, Renatita, Ana Paula y Jacob.

A mis compañeros de laboratorio: Kenia, Roberto, Sharon, Mónica, Mario, Ana, Ernestito y Citlali.

Cuando sientas que todo se pone en tu contra, recuerda que un avión despegó contra el viento, no a favor.

Henry Ford

A mi esposa y mis hijas

1 Índice

Índice.....	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Antecedentes.....	11
Hipertensión pulmonar	11
Epidemiología de la HP	12
Clasificación de la hipertensión pulmonar	13
Cambios estructurales de la Vasculatura pulmonar en la HP.....	16
Túnica íntima.....	19
Túnica adventicia.....	20
Cambios estructurales del ventrículo derecho en la HP.....	21
Reactividad Vascular de arterias pulmonares en la HP	25
Cambios Hemodinámicos en la HP	27
Síntesis de dopamina y receptores dopaminérgicos en general.....	28
Principales características de los receptores dopaminérgicos.	29
Dopamina y Receptores dopaminérgicos en el sistema cardiovascular.....	30
Dopamina y receptores dopaminérgicos en la circulación pulmonar normal	32
Efecto funcional de la dopamina en la circulación pulmonar	32
Participación de los receptores dopaminérgicos en la hipertensión pulmonar	34
Receptores dopaminérgicos en la circulación pulmonar.....	34
Justificación.....	36
Hipótesis.....	37
Objetivos	37
Objetivo general.....	38
Objetivos particulares	38
Materiales y métodos	38
Diagrama de trabajo	38
Animales.....	40
Modelo de hipertensión pulmonar genética	41
Inducción de hipertensión pulmonar con monocrotalina	41
Mediciones de presión en el ventrículo derecho.....	42
Mediciones de presión en el ventrículo derecho.....	42
Evaluación de viabilidad vascular	44
Estudios in vitro de arteria pulmonar aisladas.....	44
Efecto de agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos.....	45
Estudios bioquímicos	47

Preparación del homogénado de arteria pulmonar	48
Sacrificio y obtención de la muestra.....	50
Análisis histológico de la arteria pulmonar	50
Análisis de resultados.....	52
Resultados	53
Peso corporal	56
Peso de corazón	56
En la HP se aumenta el diámetro de la AP y el espesor del VD	56
Evaluación de la viabilidad de los anillos de arteria pulmonar (AP).....	57
Reactividad vascular.	57
Efecto de la Fenilefrina en anillos de AP	59
Efecto de la Acetilcolina en anillos de AP	60
Efecto de la Apomorfina en anillos de AP.	61
Efecto del SKF 38393 en anillos de AP.	64
Efecto del agonista del receptor dopaminérgico D ₂ , el quinpirol en la arteria pulmonar de ratas con HAP.....	66
El 7-OH-DPAT produce vasoconstricción de anillos de AP	69
El PD produce vasoconstricción de anillos de AP.....	72
La HAP reduce los niveles de óxido nítrico en la AP.....	74
La HAP produce hipertrofia de la pared de la AP	75
Discusión de resultados.....	76
Reactividad vascular a fenilefrina y acetilcolina.	79
Reactividad vascular a receptores dopaminérgicos.	81
Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D ₁ el SKF 38393.....	81
Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D ₂ el Quinpirol.	82
Reactividad vascular al agonista dopaminérgico de la familia D ₂ la apomorfina.....	82
Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D ₃ el 7-OH-DPAT.	83
Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D ₄ el PD 168077.....	84
Conclusiones.....	85
Bibliografía.....	86

2 Índice de figuras

Figura 1.- Número de orden de ramificación de las arterias pulmonares.

Figura 2.- Esquema que muestra los cambios graduales en la estructura de la pared vascular a lo largo del árbol vascular pulmonar.

Figura 3.- Cambios en la presión arterial a lo largo del sistema vascular.

Figura 4.- Estructura de la pared de una arteria donde se muestran las capas más importantes que la componen.

Figura 5.- Acople contracción-excitación de la AP.

Figura 6.-Anatomía patológica de la HAP

Figura 7.- Se muestran cortes de corazón control y con HAP

Figura 8.-Diagrama que indica los pasos a seguir para la determinación de la presión intraventricular derecha.

Figura 9.-Diagrama que indica los pasos a seguir para la evaluación de la reactividad vascular en anillos de aorta.

Figura 10.- Esquema de la reacción de Griess para la determinación de nitritos.

Figura 11.- Se muestra la correlación entre la presión de ventrículo derecho (PVD) y la estructura anatómica macroscópica del corazón

Figura 12.-Viabilidad celular con fenilefrina y acetilcolina en anillos con y sin endotelio de arteria pulmonar de ratas control y con HP-genética.

Figura 13 y 14.- Curvas concentración respuesta a fenilefrina y acetilcolina respectivamente en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y MCT.

Figura 15.- Curvas concentración respuesta a apomorfina en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y por MCT.

Figura 16.- El antagonista del receptor D_4 el L-750 bloquea el efecto vasodilatador de la apomorfina en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control.

Figura 17.- Curvas concentración respuesta a SKF 38393 en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y por MCT.

Figura 18.- El antagonista del receptor D_1 el SCH-23390 bloquea el efecto vasodilatador del SKF 38393 en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control.

Figura 19.- Curvas concentración respuesta a quinpirol en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y por MCT.

Figura 20.- El antagonista del receptor D₂ el Raclopride bloquea el efecto vasodilatador del Quinpirol en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control.

Figura 21.- Curvas concentración respuesta a 7-OH-DPAT en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y por MCT.

Figura 22.- El antagonista del receptor D₃ el U99199 bloquea el efecto vasoconstrictor del 7-OH-DPAT en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control.

Figura 23.- Curvas concentración respuesta a PD 168077 en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas control y con HAP-Espontanea y por MCT.

Figura 24.- El antagonista del receptor D₄ el L-750 bloquea el efecto vasodilatador del PD 168077 en los anillos de AP con endotelio y sin endotelio de ratas Control.

Figura 25.- En esta figura se representan en los niveles del metabolito del ON, los NO₂ en homogenados de AP.

Figura 26.- En la figura se muestra la hipertrofia de la arteria pulmonar a expensas de la hiperplasia de la capa media y adventicia.

3 Índice de tablas

Tabla 1.- Clasificación de la hipertensión pulmonar

Tabla 2.- Resumen de los estudios de reactividad vascular de la arteria pulmonar en la HAP.

Tabla 3.- Kd y Ki de agonistas de receptores dopaminérgicos utilizados en este estudio.

Tabla 4.- Parámetros generales.

Tabla 5.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP de los cuatro grupos experimentales a Fenilefrina y Acetilcolina.

Tabla 6.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP de los cuatro grupos experimentales a Apomorfina.

Tabla 7.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista Apomorfina y presencia del antagonista L-750.

Tabla 8.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista SKF 38393.

Tabla 9.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista SKF 38393 y presencia del antagonista SCH-23390.

Tabla 10.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista Quinpirole.

Tabla 11.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista Quinpirole y presencia del antagonista Raclopride.

Tabla 12.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista 7-OH-DPAT.

Tabla 13.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista 7-OH-DPAT.

Tabla 14.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista 7-OH-DPAT y presencia del antagonista U99199.

Tabla 15.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista PD 168077.

Tabla 16.- Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista PD 168077 y presencia del antagonista L-750.

4 Abreviaturas

AP: Arteria pulmonar

AC: Adenilato ciclasa

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

CML: Células de músculo liso

DA: Dopamina

ECG: Electrocardiograma

GC: Gasto cardiaco

GMP: Guanosina monofosfato cíclico

HAP: Hipertensión arterial pulmonar

HIF: Factor inducible por hipoxia.

HVD: Hipertrofia ventricular derecha

IL-1: Interleucina 1

ON: Óxido nítrico

OMS: Organización mundial de salud

PAPm: Presión arterial Pulmonar media

PDK: Piruvato deshidrogenasa cinasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PKC: Proteína cinasa c

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RVP: Resistencia vascular pulmonar

SH: Hipertensa espontánea

TH: Tirosina hidroxilasa

TXA₂: Tromboxano A₂

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VD: Ventrículo derecho

WK: WistarKyoto

5 Resumen

La terapéutica para la HAP sigue siendo limitada, a pesar de la introducción de los análogos de la prostaciclina, antagonistas de los receptores de endotelina, inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 y estimuladores de la guanilato ciclasa soluble. Estos tratamientos solo retrasan la progresión de la enfermedad, pero no ofrecen una cura. Por lo que explorar otras vías de señalización que podrían ser un blanco terapéutico eficiente en la mejoría de los síntomas y la regresión de la HAP es de gran importancia. Aquí, revisamos los efectos de la estimulación de los receptores dopaminérgicos (D_1 , D_2 , D_3 y D_4) en la arteria pulmonar. Estos receptores se ha descrito que se encuentran expresados en el árbol arterial pulmonar pero no hay claridad de los efectos fisiológicos en esta circulación. En este trabajo se utilizaron dos modelos de hipertensión arterial pulmonar (HAP) en rata. En las ratas macho Wistar Kyoto (WKY) con HAP por monocrotalina (MCT) (60 mg/Kg de monocrotalina) e Hipertensas espontáneas con HAP-Espontánea se encontró que la presión sistólica, el peso y el grosor del ventrículo derecho y el diámetro de la AP fueron mayores en comparación con su control (HAP-MCT: 62 ± 3.02 mmHg, 0.268 ± 0.018 g, 2.8 ± 0.11 mm; HAP-espontánea: 43 ± 1 mmHg, 0.375 ± 0.12 g, 2.9 ± 0.1 mm; $p < 0.05$) y los nitritos se encontraron reducidos en las AP de ratas con HAP de ambos grupos (control: 15.3 ± 0.05 VS HAP-MCT: 4.9 ± 0.18 ; HAP-Espontánea: 4.4 ± 0.16 μ M). En estos mismos grupos, hubo una respuesta reducida a la fenilefrina y acetilcolina en comparación con sus controles en anillos con y sin endotelio (acetilcolina en anillos con endotelio: Control: 93 ± 1.4 vs HAP-MCT: 33.25 ± 1.1 ; HAP-espontánea: 52.25 ± 3.96 % $p < 0.05$), la respuesta con el agonista D_3 (7-OHDPAT), produjo un efecto vasoconstrictor en todos los grupos siendo menor en los grupos con HAP, mientras que la apomorfina y el agonista D_4 (PD 168077), produjeron una respuesta vasodilatadora mayor a la acetilcolina en anillos sin endotelio en los grupos con HAP (% de relajación con el agonista D_4 : HAP-MCT: 81 ± 1.5 ; HAP-espontánea: 97 ± 0.5 vs por acetilcolina : HAP-MCT: 33.25 ± 1.1 ; HAP-espontánea: 52.25 ± 3.96 ; $p < 0.05$). Los resultados sugieren que la activación del receptor D_4 sería un blanco terapéutico para el control de la HAP debido a que produce relajación independiente de endotelio y en esta patología la relajación dependiente de endotelio esta atenuada por el daño endotelial.

6 Introducción

6.1 Hipertensión pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una condición clínica que se caracteriza por una vasoconstricción sostenida y la remodelación de la arteria pulmonar, lo que promueve la obstrucción crónica de los vasos de pequeño calibre y como consecuencia aumenta la resistencia vascular pulmonar generando una sobrecarga al ventrículo derecho (VD) lo que desencadena en la insuficiencia del VD, la cual es el principal determinante de la esperanza de vida de los sujetos con HAP. La insuficiencia del VD está determinado por la progresión de los cambios estructurales en la microcirculación pulmonar y la respuesta adaptativa del VD. El valor de presión de la AP que determina que un paciente cursa con HP es por arriba de 25 mmHg en reposo y/o 30 mmHg en ejercicio cuando se mide por cateterismo (Farber y Loscalzo 2004). De acuerdo a los valores de presión media de la AP podemos tener: HP leve (25-40 mm HG), HP moderada (40-55 mm Hg) y HP severa (>55 mm Hg). La severidad de la HP está relacionada con el pronóstico de supervivencia (Lai y cols., 2014).

6.2 Epidemiología de la HP

Los primeros estudios multicéntricos fueron realizados en el Instituto Nacional de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) fue un estudio que recopiló datos prospectivamente de 1981 a 1985 de 32 centros de salud en los Estados Unidos. Se incluyeron 187 pacientes con HAP idiopática, hereditaria o asociada a anorexígenos. La edad media del inicio de la enfermedad fue de 36 ± 15 años y la mayoría de los pacientes eran mujeres. La distribución de pacientes según la raza fue de 85.4% de raza blanca, 12.3% de afroamericanos y 2.3% de hispanos. El intervalo de tiempo entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico fue de 2 años. La disnea fue el síntoma de más frecuente, seguido de fatiga y síncope. Los pacientes en el registro tenían HAP grave basada en hemodinámica con una presión media de la AP de 60 ± 18 mm Hg, la supervivencia estimada fue de 2,8 años, con una supervivencia a 1 año del 68%, una supervivencia a 3 años del 48% y una supervivencia a 5 años del 34%.

Sin embargo, las características epidemiológicas varían entre las diferentes razas. Estudios de morbilidad y la mortalidad mostraron que la mortalidad asociada con la HP varía de 4.5% a 7.3% en afroamericanos y de 5% a 5.5% en blancos. Además, las tasas de supervivencia de

la HP son de 1, 3 y 5 años es del 68%, 48% y 34% respectivamente, con una supervivencia media estimada de 2,8 años (George y cols., 2014). En Asia, la prevalencia potencial de HP puede ser mayor; sin embargo, faltan estudios epidemiológicos a gran escala. En China, se ha informado que el 6,6% de todos los pacientes hospitalizados tienen HP, con 65.9% de los casos relacionados con enfermedades cardíacas congénitas, de las cuales el 22.6% están relacionadas con enfermedades del corazón izquierdo, 5.7% de enfermedades trombóticas, 0.9% de enfermedades respiratorias y el 0,6% a enfermedades del tejido conectivo (Zhang y cols., 2011). Otro estudio informó que después de 40,1 meses de seguimiento, las tasas de supervivencia a 1, 2, 3 y 5 años fueron 68.0%, 56.9%, 38.9% y 20.8% respectivamente (Jing y cols., 2007). Sin embargo, cuando estos estudios se llevaron a cabo hubo una falta de tratamiento eficaz y con las mejoras en las estrategias de tratamiento actualizadas los datos pueden haber cambiado.

El registro español también reclutó 866 casos prevalentes e incidentes de PH entre 2007 y 2008 y calculó tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años de 87%, 75% y 65% respectivamente. En el registro francés, que también analizó casos de prevalencia e incidencia para una subpoblación de 190 pacientes con HP, HAP hereditaria y casos de HAP asociados a anorexígenos entre 2002 y 2003 se calculó una tasa de supervivencia a 1 año de 83% y 3 años de 58%, en el Reino Unido se centró la atención en la incidencia de HP entre 2001 y 2009 se incluyeron 482 pacientes con HP con tasas de supervivencia de 1, 3 y 5 años del 93%, 73% y 61% respectivamente (Humbert y cols., 2010).

En México, así como en América Latina, no existen datos específicos sobre la prevalencia. Debido a esto, se tiene en desarrollo el Registro Latinoamericano de Hipertensión Pulmonar (RELAHP), proyecto observacional y multicéntrico perteneciente al Departamento de Circulación Pulmonar de la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT), que inició en abril de 2014 y finalizará en marzo de 2019

Tomando en cuenta estos estudios se podría decir que esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia a una edad temprana (la edad media del diagnóstico es de alrededor de 45 años) y se asocia con una esperanza de vida de 2 a 3 años después del inicio de los síntomas (Sandoval y cols., 1993). Esta patología tiene una prevalencia a nivel mundial de 26 casos por millón de población adulta (Morales-Blanhir y cols., 2014).

6.3 Clasificación de la hipertensión pulmonar

No siempre está claro como comienza la enfermedad, hace más de cinco décadas, se introdujo el término de HP primaria para describir al aumento de la presión arterial pulmonar y los cambios vasculares asociados que se producen exclusivamente en la circulación pulmonar y que no tienen una causa identificable. Además, la hipertensión pulmonar secundaria fue el término utilizado para describir la asociación a otras enfermedades. Durante las últimas décadas, los avances en nuestra comprensión de los aspectos clínicos y patológicos de hipertensión pulmonar han llevado a la necesidad de un sistema de clasificación más útil y precisa. Una nueva clasificación para la hipertensión pulmonar se introdujo en el simposio de la Organización Mundial de la Salud sobre esta enfermedad en Evian, Francia, en 1998. El propósito general de esta clasificación es agrupar mediante las similitudes clínicas, fisiopatología, características hemodinámicas y terapéutica existente entre los diferentes tipos de HP (Galei y cols., 2015).

Tabla 1.- Clasificación de la HP

6.4	Hipertensión arterial pulmonar
6.5	1.1 Idiopática
6.6	1.2 Heredable
6.7	1.2.1 Mutación del gen BMPR2
6.8	1.2.2 Otras mutaciones
6.9	1.3 Inducida por drogas y toxinas
6.10	1.4 Asociado con:
6.11	1.4.1 Enfermedad del tejido conectivo
6.12	1.4.2 infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
6.13	1.4.3 Hipertensión portal
6.14	1.4.4 Enfermedad congénita del corazón
6.15	1.4.5 Eschistosomiasis
6.16	2. Hipertensión pulmonar secundaria a enfermedad del corazón izquierdo
6.17	2.1 Disfunción sistólica ventricular izquierda.
6.18	2.2 Disfunción diastólica ventricular izquierda.
6.19	2.3 Enfermedad valvular.
6.20	2.4 Influjos congénitos / adquiridos del corazón izquierdo / obstrucción del tracto de salida y cardiomiopatías congénitas.
6.21	2.5 estenosis pulmonar venosa congénita y adquirida.
6.22	3. Hipertensión pulmonar por enfermedades pulmonares y / o hipoxia
6.23	3.1 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
6.24	3.2 Enfermedad pulmonar intersticial
6.25	3.3 Otras enfermedades pulmonares con patrón mixto restrictivo y obstructivo
6.26	3.4 Trastornos respiratorios del sueño
6.27	3.5 Trastornos de hipoventilación alveolar
6.28	3.6 Exposición crónica a gran altitud
6.29	3.7 Enfermedad pulmonar de desarrollo

6.30	4. Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica y otras obstrucciones de la arteria pulmonar
6.31	4.1 Hipertensión pulmonar crónica tromboembolica
6.32	4.2 Otras obstrucciones de la arteria pulmonar
6.33	4.2.1 Angiosarcoma
6.34	4.2.2 otros tumores intravasculares
6.35	4.2.3 Arteritis
6.36	4.2.4 Estenosis de la arteria pulmonar congénita
6.37	4.2.5 Parasitosis
6.38	5. Hipertensión pulmonar con mecanismos multifactoriales pocos claros
6.39	Otras Causas
6.40	5.1 Desordenes hematológicos: anemia hemolítica crónica, desorden mieloproliferativo, esplenectomía.
6.41	5.2 Desordenes sistémicos: Sarcoidosis, histiocitosis pulmonar, neurofibromatosis.
6.42	5.3 Desordenes metabólicos: desorden de almacenaje de glucógeno, enfermedad de Gaucher. Desordenes de la tiroides.
6.43	5.4 Otros: microangiopatíatrombotica tumoral pulmonar, mediastinitis fibrosa, insuficiencia renal, hipertensión pulmonar segmentada.

En el simposio más reciente para esta enfermedad que se celebró en Niza en febrero de 2013 (Galei y cols ., 2015) se propuso una nueva clasificación la cual comprende cinco grupos: En el grupo 1, se agrupan la HP idiopática, genética, por drogas y toxinas y la asociada con enfermedad del colágeno, por VIH, por hipertensión portal; en el grupo 2 es debido a la enfermedad cardíaca izquierda, en el grupo 3 se agrupan a la HP debida a enfermedades pulmonares y / o hipoxia, entre las que se encuentran el EPOC, Enfermedad pulmonar intersticial, trastornos respiratorios del sueño, trastornos hipoventilación alveolar, la exposición crónica a gran altitud. En el grupo 4 está la HP asociada a enfermedad tromboembólica crónica y finalmente en el grupo 5 se agrupa a la HP que es causada por mecanismos multifactoriales poco claros (Tabla 1).

Esta clasificación permitió definir grupos homogéneos de pacientes para realizar ensayos clínicos y obtener la aprobación para terapias específicas para la HP en todo el mundo. Los individuos con HAP presentan síntomas que no son específicos de esta enfermedad, entre los que se encuentran, la disnea, mareos e intolerancia al ejercicio, lo que hace difícil el diagnóstico temprano.

Independientemente del mediador de la hipertensión pulmonar, la afección es progresiva y se inicia con la remodelación vascular en varios grados de daño, afectando a la adventicia, la

media y la íntima de las arterias pulmonares distales, frecuentemente se presenta una obliteración vascular completa, ocasionando un incremento sostenido de la resistencia vascular pulmonar (Tuder y cols, 2009), en consecuencia al aumento de la resistencia vascular los pacientes desarrollan hipertrofia ventricular derecha compensatoria, que se convierte rápidamente en insuficiencia ventricular derecha (Bogaard y cols., 2009; Van de Veerdonk y cols., 2011) lo que ocasiona la muerte prematura del paciente.

6.3 Cambios estructurales de la vasculatura pulmonar en la HP.

Los cambios estructurales de las arteriolas pulmonares que resultan en disfunción de los vasos pulmonares, la sobrecarga del ventrículo derecho (VD) y en última instancia la insuficiencia del VD son un mecanismo fisiopatológico central que conduce al desarrollo de HP clínicamente evidente. La hipótesis del desarrollo de la HP propone que en presencia de un sustrato genético y/o molecular predisponente aunado a la exposición a ciertos mediadores biológicos o ambientales inician una cascada de eventos de señalización celular adversos que culminan en malformaciones estructurales y funcionales de los vasos pulmonares.

Aunque no se precisa cual sea el evento que inicie los mecanismos fisiopatológicos para el desarrollo de HP se observa que los niveles de serotonina en sangre, un vasoconstrictor proliferativo, fibrogénico, están elevados (Herve y cols., 1995), en el endotelio la relación de vasodilatador/vasoconstrictor esta reducida debido a que existe disfunción endotelial de los vasos pulmonares, además, los niveles de óxido nítrico (ON) están reducidos desde etapas tempranas de muchas formas de HP. (Christman y cols., 1992), mientras que los factores protrombóticos también están incrementados (White y cols., 2007). Se ha estudiado que la apoptosis endotelial generalizada que se produce al inicio de la HP culmina en que las células precursoras endoteliales resistentes a la apoptosis proliferen y eventualmente formen lesiones plexiformes (Sakao y cols., 2005). También se suprime la apoptosis de las células del músculo liso de la arteria pulmonar, lo que resulta en su proliferación, que combinada con el reemplazo por colágeno de las células de la íntima conduce a la aparición clásica de hiperplasia de la íntima (Lansberg y Yuan y cols., 2004).

Es importante destacar que el lecho vascular pulmonar alberga la mayor densidad de tejido vascular dentro del sistema circulatorio humano (Barst y cols., 2011); por lo tanto, perturbaciones sutiles de las vías de señalización que regulan la estructura y función de las

células dentro de la interfaz de la circulación alveolo-pulmonar pueden traducirse en cambios significativos en el rendimiento cardiopulmonar.

Estos eventos que ocurren en la circulación pulmonar en la HP generan cambios estructurales en los vasos pulmonares, tales como, la hiperplasia de la capa íntima, hipertrofia de la capa media, proliferación de la adventicia, trombosis *in situ*, infiltración de células inflamatorias y la presencia de "lesiones plexiformes" (Archer y cols., 2010). Los cambios fisiopatológicos clásicos en la HAP se describen mediante la clasificación de Heath Edwards: Grado 1: hipertrofia medial; Grado 2: proliferación y engrosamiento de la íntima; Grado 3: la formación de lesiones neo íntimas laminares concéntricas y Grado 4: el desarrollo de lesiones plexiformes (Yamaki 2004).

6.3.1 Túnica íntima

La túnica íntima también se afecta en la HP en respuesta a ciertos estímulos en donde las células endoteliales proliferan anormalmente (Tuder y cols., 1994), esta alteración del endotelio pulmonar se ve reflejada en cambios fenotípicos que las diferencian de las células endoteliales pulmonares normales. Por ejemplo, las células endoteliales con lesiones plexiformes muestran una reducción o pérdida de la síntesis de sustancias vasorelajadoras, como las prostaciclina (Turder y cols., 1999) y óxido nítrico (Kaneko y cols., 1998; Cella y cols., 2001) y aumento en la síntesis de moléculas que producen vasoconstricción, como lo son la endotelina (Stewart y cols., 1991) y el tromboxano A2 (Christman y cols., 1992).

Las lesiones plexiformes consisten en proliferación de células endoteliales, proteínas de la matriz extracelular y fibroblastos, lo que produce la alteración y obliteración de la luz vascular. Los estímulos para la proliferación endotelial aún se desconocen, pero está relacionado con varios factores, como la hipoxia, procesos inflamatorios, el estrés por cizallamiento, fármacos, infecciones virales y susceptibilidad genética. La generación de las lesiones endoteliales está relacionada con mecanismos inflamatorios que parecen desempeñar un papel importante en ciertas formas de HAP, como la HAP asociada con enfermedades autoinmunes o infección por VIH. De echo el 30 al 40% de los pacientes con HAP tienen autoanticuerpos circulantes y concentraciones plasmáticas elevadas de citosinas pro inflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina-6 (IL-6). Las células que participan en procesos inflamatorios, como los linfocitos B y T, macrófagos y mastocitos,

también se pueden encontrar en las lesiones plexiformes de la HAP grave (Itoh y cols., 2006). A nivel endotelial otro de los mecanismos que participan en la alteración estructural de los vasos pulmonares en la HP es la trombosis in situ y la disfunción de las plaquetas. Las concentraciones plasmáticas elevadas del factor de Von Willebrand y del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 también reflejan que existe disfunción endotelial en la HP. Se ha demostrado que el estrés por cizallamiento crea lesiones vasculares pro-trombóticas en la HAP que pueden conducir a la trombosis in situ.

Pero la función plaquetaria no se limita a la coagulación. En respuesta a ciertos estímulos, las plaquetas pueden producir factores protrombóticos, vasoactivos o mitogénicos, como el tromboxano A₂ (TXA₂) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Herve P. y cols., 1995). Estas células endoteliales con lesiones plexiformes expresan aumento en los marcadores de angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores. Además, se han encontrado defectos en los genes que codifican para moléculas supresoras del crecimiento celular como lo es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y con la disminución de la proteína Bax, una

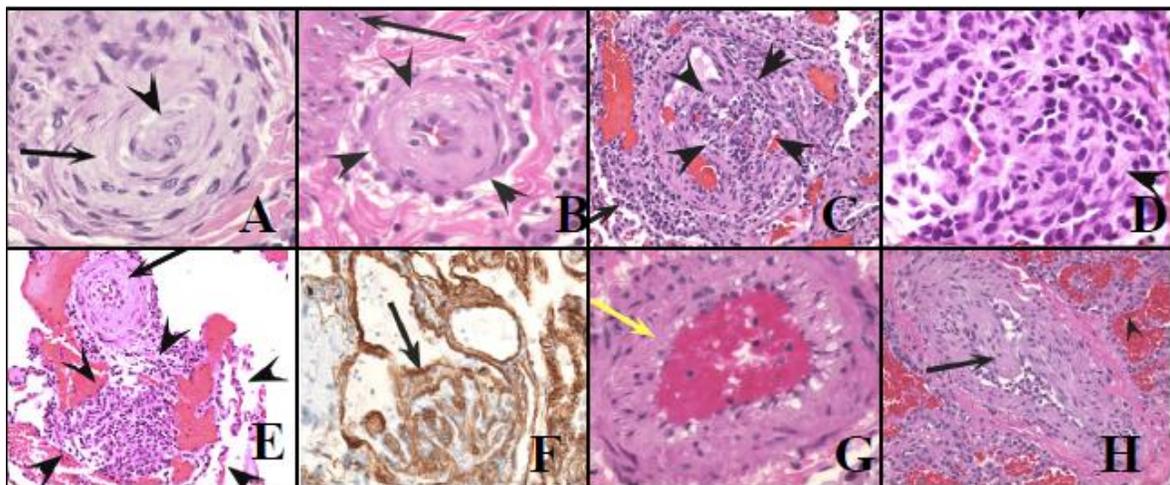


Figura 6. Anatomía patológica de la HAP. (A) Lesión concéntrica. (B) Engrosamiento fibrótico y acelular de la íntima. (C) Lesión plexiforme con infiltrado inflamatorio periférico. (D) Lesión plexiforme a mayor aumento: canales vasculares rodeados de células endoteliales. (E) Lesión plexiforme y arteria pulmonar con marcado engrosamiento intimal e hipertrofia de la media. (F) Lesión angiomatoide: tinción especial del colágeno tipo IV. (G): Hipertrofia de la media. (H): Enfermedad venooclusiva: engrosamiento de la íntima de la pared venosa a expensas de la íntima, correspondiendo probablemente a trombo organizado.

proteína inductora de la apoptosis celular. Este remodelamiento de los vasos arteriales pulmonares desencadena una obliteración vascular completa ocasionando un incremento en la resistencia vascular. (Tuder 2009). Los vasos severamente obstruidos limitan el flujo sanguíneo a través de las arterias pulmonares con un incremento significativo de la poscarga para el ventrículo derecho contribuyendo así al desarrollo de hipertrofia, dilatación e insuficiencia del ventrículo derecho (Voelkel y cols., 2012). Estas alteraciones generan la disfunción endotelial que a la vez promueve la proliferación de varios tipos de células, incluyendo las células del músculo liso, células endoteliales y fibroblastos que conduce a la remodelación vascular. Estos vasos remodelados estructuralmente se asemejan a los vasos de resistencia de la circulación sistémica.

6.3.2 Túnica media

El proceso de remodelación involucra casi universalmente un engrosamiento medial, impulsado por un mayor número e hipertrofia de su principal componente celular, las células musculares lisas (CML); junto con estos procesos, las CML exhiben una producción aumentada de quimiocinas y citoquinas (interleucina 1 ($IL-1\beta$) e interleucina 6 ($IL-6$)) (Stenmark y cols., 2018), alteraciones en la producción y degradación de proteínas de la matriz extracelular (Poiani y cols., 1990).

Una característica temprana y constante en esta enfermedad es la hiperplasia de la túnica media (CML), esto es importante debido a la función que desempeña el músculo liso en el control vascular, que es la de cambiar el diámetro de las arterias por el mecanismo de la contracción y la relajación vascular (Hopkins N y McLoughlin P., 2002). En arteriolas no musculares, se observa la proliferación de células del músculo liso que se derivan de la diferenciación de células intermedias que están presentes en las paredes normales de estos vasos y por la migración y diferenciación de fibroblastos intersticiales (Jones, 1992). También existe aumento de tejido conectivo y se duplican las fibras elásticas (Pietra 1994)

Se han descrito alteraciones en la vía de fosforilación oxidativa mitocondrial a la glucólisis en CML, así como en células endoteliales y fibroblastos. Este fenotipo se ha descrito en el cáncer y es denominado Efecto Warburg y contribuye tanto a la hiperproliferación de las CML pulmonares especialmente al inicio de la enfermedad como a

la resistencia a la apoptosis (con la enfermedad establecida) (Sutendra y cols., 2014). Este cambio metabólico aumenta la disponibilidad de aminoácidos, lípidos y azúcares no oxidados, que son todos necesarios para la rápida proliferación celular. Además, se ha descrito que, en la HP las CML tienen mitocondrias hiperpolarizadas, que producen menos ROS (Ryan y cols., 2015). La disminución en la producción de ROS mitocondrial está asociada con la disminución en la activación de canales de potasio (Kv1.5), el aumento de los niveles de calcio intracelular y la actividad incrementada de los factores de transcripción, incluido el factor inducible por hipoxiael-1 α (HIF-1 α), lo que lleva a una mayor proliferación y disminución de la apoptosis. Estos cambios son relevantes no solo para el estado de hiperproliferación, sino también para la resistencia a la apoptosis de CML, de células endoteliales y de ciertas poblaciones de fibroblastos de la adventicia (D'Alessandro y cols., 2018).

Otra vía que esta alterada en la señalización de las CML es el aumento de la señalización de factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). La señalización alterada de TGF- β se relaciona con la mutación genética del receptor de la proteína morfogénica ósea tipo 2 (BMP2) que subyace a la mayoría de los casos familiares de HAP. También se ha informado que el proceso inflamatorio impulsa el reclutamiento de trombospondina-1 (un conocido activador del TGF- β) el cual activa a su receptor en los monocitos en la adventicia pulmonar, lo que resulta en la activación del TGF- β y en la expansión de la capa medial del vaso pulmonar. (Kumar y cols., 2017).

6.3.3 Túnica adventicia

La Hipertrofia de la adventicia es también una característica prominente de la HP, El aumento de la producción de la matriz extracelular incluyendo el colágeno, la elastina, la fibronectina y factor de crecimiento fibroblástico resultan en el engrosamiento y fibrosis de la capa adventicia, esto en respuesta a la hipoxia y la inflamación crónica presente en esta enfermedad (Meyrick y Reid, 1979).

Los fibroblastos adventicios también son hiperproliferativos en la HP y muestran una mayor sensibilidad a la serotonina. Los autoanticuerpos circulantes y la infiltración pulmonar de células inflamatorias son comunes, particularmente en la HAP asociada con la enfermedad del tejido conectivo y la esquistosomiasis.

6.4 Cambios estructurales del ventrículo derecho en la HP.

Aunque la alteración inicial en la HAP es en la vasculatura pulmonar, la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad está estrechamente relacionada con la función del ventrículo derecho (VD) (Benza y cols., 2010). El ventrículo derecho se adapta al aumento de la poscarga aumentando el grosor de la pared y la contractilidad (Hipertrofia adaptativa). Sin embargo, en la gran mayoría de los pacientes, estos mecanismos compensatorios son insuficientes y se produce disfunción del VD (Hipertrofia desadaptativa).

Fisiológicamente, la función del ventrículo derecho para mantener un flujo normal de la sangre a través de la circulación pulmonar se determina esencialmente por mecanismos similares a los del ventrículo izquierdo, por tres factores: la precarga, la poscarga y la contractilidad. La precarga representa la carga impuesta a las fibras del miocardio al final de la diástole y es proporcional a su máxima elongación. La contractilidad miocárdica o inotropismo se refiere a la capacidad del miocardio para contraerse y aunque, la poscarga que en términos generales se puede definir como los factores externos opuestos al acortamiento de la fibra muscular.

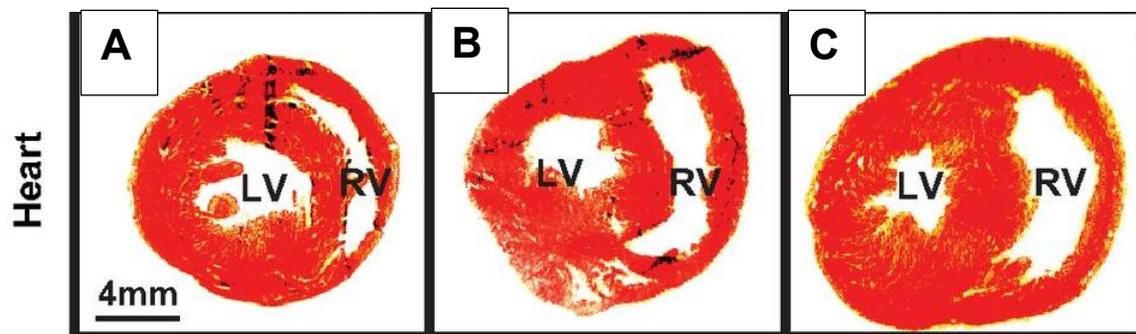


Figura 7.- En la A se muestra a un corazón de una rata control, en donde vemos a la pared del ventrículo derecho de grosor normal, en B se observa hipertrofia del ventrículo derecho en un corazón de rata con inducción de HP con monocrotalin y en C el ventrículo derecho se encuentra dilatado. (Matori y cols. 2012)

Por lo tanto, cuando existe un aumento de la resistencia vascular pulmonar en el contexto de la hipertensión pulmonar, el ventrículo derecho se somete a una serie continua de cambios hemodinámicos y morfológicos.

Una vez que la poscarga o la precarga se altera en la HP y con el fin de preservar la función cardíaca adecuada, el VD inicia mecanismos de adaptación intrínsecos, que incluyen la autorregulación de la dimensión ventricular heterométrica (basado en el mecanismo de

Frank-Starling), esta es en respuesta a los cambios en la precarga y autorregulación homeométrica (basado en el efecto Anrep), que es el aumento de la contracción miocárdica. Estos mecanismos son en respuesta a aumento de la poscarga con el fin de producir un aumento compensatorio en el volumen sistólico. Después de que los mecanismos de adaptación iniciaron, el VD comienza una remodelación estructural más durable. El VD responde al aumento de la sobrecarga de presión mediante la acumulación de masa muscular a través de la adición de sarcómeros en paralelo en los cardiomiocitos, resultando en una remodelación adaptativa con hipertrofia ventricular concéntrica, pero manteniendo la función sistólica y diastólica normal (Grossman y cols., 2013). Sin embargo, al mantenerse el aumento en la poscarga el VD continúa con la hipertrofia, pero en este caso es excéntrica y con función diastólica y sistólica alterada desencadenando en la dilatación, fibrosis y la insuficiencia del VD.

La remodelación ventricular se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos incluyendo la isquemia, la fibrosis, la desregulación autonómica y cambios metabólicos que desencadenan en la insuficiencia del VD.

Por lo tanto, es posible definir la insuficiencia del VD como un síndrome de fatiga disnea con la congestión venosa sistémica eventual, causado por la incapacidad del ventrículo derecho para mantener la producción de flujo en respuesta a la demanda metabólica sin adaptación heterométrica, y el consiguiente aumento en el corazón presiones de llenado adecuadas. Esta definición abarca un espectro de situaciones clínicas, desde conservado gasto cardíaco máximo y la capacidad de ejercicio aeróbico en el precio del aumento de las variedades esencialmente derivadas de VD y espesor de pared (por lo tanto, elevada presiones de llenado diastólico) para estados de baja salida con volúmenes pequeños de VD en reposo.

Existe también alteración en la angiogénesis, en la señalización adrenérgica, también se ha encontrado un aumento del péptido natriurético cerebral, la liberación de troponina y niveles de catecolaminas elevados. Existe también una reducción de la respuesta inotrópica positiva adrenérgica debido a la regulación a la baja y desensibilización de estos receptores acoplados a proteínas G (Ryan y Archer 2014).

La fibrosis, la isquemia, la desregulación autonómica y los cambios metabólicos son factores que determinan si la hipertrofia del ventrículo derecho será bien tolerada o no

(Hipertrofia adaptativa o hipertrofia desadaptativa respectivamente). En la hipertrofia adaptativa el gasto cardíaco, las presiones de llenado y la tolerancia al ejercicio se mantienen normales, caracterizándose generalmente por hipertrofia concéntrica con mínima dilatación del VD o fibrosis. Por el contrario, en la hipertrofia desadaptativa existe reducción significativa en el gasto cardíaco, elevación de las presiones de llenado del VD y disminución de la resistencia al ejercicio, además de una mayor fibrosis y dilatación del VD (Kurzyna y cols., 2008).

Se han encontrado distintos mecanismos que participan en el paso de la hipertrofia adaptativa a la desadaptativa, como por ejemplo un deterioro de la angiogénesis, que se manifiesta con la disminución de la expresión de genes angiogénicos (VEGF, IGF-1 y angiopoeitina-1). También se presenta desregulación del sistema nervioso autónomo que se manifiesta con regulación a la baja y sensibilización de los receptores α y β -adrenérgicos en los miocitos del VD (Oikawa y cols., 2005).

El sistema adrenérgico está sobre activado en la insuficiencia del VD. Se ha encontrado en los pacientes con HAP niveles elevados de catecolaminas circulantes y pierden la capacidad normal de aumentar los niveles de catecolaminas durante el ejercicio (Nootens y cols., 1995). La activación autónoma y la pérdida de inotropía a los agonistas adrenérgicos- β podría ser debido a la regulación a la baja de la expresión de receptores adrenérgicos- β_1 en la HAP en humanos y en modelos animales (Usui y cols., 2006). En humanos (Bristow y cols., 1992) y roedores (Ishikawa y cols., 1991) que presentan insuficiencia ventricular derecha la densidad de receptores adrenérgicos- β se encuentran a la baja (α_1 , β_1 y dopamina). La causa de la regulación a la baja de la expresión y función de los receptores adrenérgicos fue la activación del receptor cinasa 2 acoplada a proteínas G (GRK2). El desacople y la regulación a la baja receptor β_1 redujeron la respuesta del VD a los inótrupos.

En la insuficiencia ventricular derecha desadaptativa se asocia con una disminución del factor inducido por hipoxia α (HIF1- α) resultado del aumento de las especies reactivas de oxígeno derivadas de la mitocondria que potencialmente da como resultado la inhibición de este factor (HIF1- α), suprimiendo así la angiogénesis. La isquemia resultante de la disminución de la angiogénesis puede contribuir al rápido deterioro de la función del VD en un modelo de HAP por MCT (Sutendra y cols., 2013).

Se ha demostrado un aumento de la captación de glucosa por el VD en la hipertrofia ventricular desadaptativa que refleja el aumento de la glucólisis, ya que se han encontrado aumentados marcadores de glucólisis aeróbica como lo son el transportador de glucosa Glut 1 y la piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) en la HAP. En modelos animales de HAP por MCT la inhibición de la PDK restaura la contractilidad del VD (Piao y cols., 2010). La activación patológica de factores de transcripción en el ventrículo derecho en la HAP (por ejemplo, HIF1- α y FOXO1) conduce a cambios en el metabolismo, en particular a la activación de PDK2 y PDK4. Esto disminuye la expresión de los canales de potasio activados por voltaje repolarizantes (Kv), como el Kv1.5, en los miocitos cardíacos. En los modelos de roedores de RVH, esta remodelación iónica da como resultado una prolongación de la duración del potencial de acción monofásica del RV y una prolongación leve del intervalo QT en el electrocardiograma de superficie. La terapia con el inhibidor PDK DCA restaura el metabolismo oxidativo de la glucosa y restaura la expresión del canal Kv que conduce a la normalización de los intervalos QT (Fang y cols., 2012).

7 Antecedentes

7.1 Reactividad Vascular de arterias pulmonares en la HP

Se demostrado que en pacientes y en modelos animales de hipertensión pulmonar existe aumento en la reactividad vascular pulmonar a agentes vasoconstrictores y una disminución en la respuesta a agentes vasodilatadores. De acuerdo con eso, los estudios en modelos animales y en los pacientes sugieren que la vasodilatación pulmonar dependiente de ON está alterada en la hipertensión pulmonar (Budhiraja y cols., 2004). Evaluando la reactividad vascular en mujeres jóvenes con hipertensión pulmonar severa se encontró que el óxido nítrico produjo una disminución moderada de la presión arterial pulmonar y resistencia vascular pulmonar. En estudios en donde el óxido nítrico es inhalado por pacientes con hipertensión pulmonar produjo una disminución de la presión arterial pulmonar media como consecuencia de la reducción de la resistencia vascular pulmonar (Skoro y cols., 2007). El mismo efecto se vio cuando se administraba vía oral al epoprostenol (análogo de la prostaglandina 2) (Ricci y cols., 2007; Klinger y cols., 2006) y la combinación del péptido natriurético cerebral más sildenafil (Klinger y cols., 2006). Por otro lado, la relajación

inducida con un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 el vardenafil también esta disminuida en las arterias pulmonares de ratas con HP con monocrotalina (Kim y cols., 2015). También se ha encontrado que la relajación inducida con nitroprusiato de sodio esta disminuida en las arterias pulmonares de ratas con HAP con monocrotalina (Csiszar y cols., 2009)

Por otra parte, en el modelo de HP en ratas inducido con monocrotalina se ha encontrado que la respuesta vascular a diferentes sustancias vasoactivas esta alterada y que podría contribuir a la patogénesis de la HP. En este modelo la respuesta contráctil a noradrenalina y angiotensina II (Altiere y cols., 1986) y fenilefrina (Christou y cols., 2012; Mam y cols., 2010) está disminuida con respecto a los no tratados con monocrotalina.

Se observaron disminuciones significativas de la contractilidad con una pérdida específica en la respuesta a la angiotensina II en las arterias pulmonares aisladas de ratas 14 días después de la administración de monocrotalina. Estos vasos también fueron menos sensibles a los efectos relajantes del isoproterenol y la acetilcolina en comparación con los vasos de control.

Además de una hiperreactividad de la arteria pulmonar a 5-hidroxitriptamina (Brown y cols., 1998; Kanai y cols., 1993; Wanstall . y O'Donnell . 1990).

La administración del antagonista del receptor de endotelina ET_A el LU 135352 revierte el deterioro en la vasodilatación que ejerce la acetilcolina en un modelo de hipertensión pulmonar secundario a insuficiencia cardíaca congestiva, lo que sugiere que la reactividad vascular a endotelina esta aumentada en este modelo de HP (Lucas y cols., 2001).

También se ha reportado que la arteria pulmonar de ratas tratadas con monocrotalina presentan disminución en la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina (Altiere y cols., 1986; Christou y cols., 2012; Mam y cols., 2010), nitroprusiato de sodio (Christou y cols., 2012; Mam y cols., 2010) e isoproterenol (Altiere y cols., 1986).

Tabla 2. Resumen de los estudios de reactividad vascular de la arteria pulmonar en la HAP.

Resumen de reactividad vascular en la arteria pulmonar en la HAP				
Fármaco	Efecto	Efecto en la HAP	Especie	Bibliografía
Óxido nítrico inhalado	Vasodilatación	Vasodilatación disminuida	Humano	Skoro N. y cols., 2008; Ricci G. y cols., 2007

Epoprostenol (análogo de la prostaglandina 2)	Vasodilatación	Vasodilatación disminuida	Humano	Ricci G. y cols., 2007; Klinger J. y cols., 2006
Vardenafil (inhibidor de la fosfodiesterasa 5)	Vasodilatación	Vasodilatación disminuida	Rata	(Karasuminaresi E., 2012).
Acetilcolina	Vasodilatación	Vasodilatación disminuida	Rata	Altiere R., 1986; Christou H. y cols., 2012; Mam V. y cols., 2010
Isoproterenol	Vasodilatación	Vasodilatación disminuida	Rata	Altiere R., 1986
Noradrenalina	Vasoconstricción	Vasoconstricción disminuida	Rata	Altiere R. y cols., 1986; Dehin S. y cols., 2002
Fenilefrina	Vasoconstricción	Vasoconstricción disminuida	Rata	Christou H. y cols., 2012; Mam V. y cols., 2010
Angiotensina II	Vasoconstricción	Vasoconstricción disminuida	Rata	Altiere R. y cols., 1986; Dehin S. y cols., 2002
Serotonina	Vasoconstricción	Vasoconstricción aumentada	Rata	Brown L y cols., 1998; Kanai Y. y cols., 1993; Wanstall j. y O'Donnell S. 1990
Endotelina	Vasoconstricción	Vasoconstricción aumentada	Rata	Lucas M. y cols., 2001

7.2 Cambios Hemodinámicos en la HP

En condiciones normales la resistencia vascular pulmonar (RVP) es 1/20 la resistencia vascular sistémica y la presión media de la arteria pulmonar puede no ser mucho más alta que la presión venosa central. Debido a que un gradiente de presión de 5 mm Hg a través de la circulación pulmonar es suficiente para mantener el gasto cardíaco anormal en condiciones de RVP normal.

La elevación de la presión pulmonar se asienta sobre cuatro pilares fisiopatológicos: 1) vasoconstricción, 2) pérdida de área del lecho vascular pulmonar secundaria a la oclusión y remodelado de las arteriolas, 3) pérdida de elasticidad vascular y 4) reducción de los mecanismos de vasodilatación activa.

En fases iniciales, la alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio es reversible con la infusión de vasodilatadores como la acetilcolina (Uren y cols., 1992) y sin embargo se puede presentar una disminución en la vasodilatación durante el ejercicio, en esta situación, compensada o presintomática, la PAPm es normal en reposo, pero supera los 30 mm Hg al ejercicio (Gómez y cols., 1990). El gasto cardíaco (GC) se mantiene normal. Estos pacientes están asintomáticos en reposo, pero presentan disnea con grandes esfuerzos y una limitación moderada de la capacidad aeróbica. En la fase tardía, la vasodilatación dependiente e

independiente del endotelio está disminuida. La respuesta vasodilatadora fisiológica durante el ejercicio no existe, de forma que cuando el GC se incrementa por la actividad física las presiones pulmonares se elevan de forma dramática. Conforme avanza la enfermedad, la severidad de las lesiones vasculares fijas como los efectos sobre el VD (hipertrofia, isquemia, dilatación y regurgitación tricúspide) hacen imposible el mantenimiento de un adecuado volumen minuto al esfuerzo, y en fases más avanzadas, también en reposo. Clínicamente, los pacientes refieren disnea con ejercicio suave y su capacidad aeróbica está considerablemente reducida. La última fase (HAP descompensada) se caracteriza por una disminución del GC en reposo, que prácticamente no puede elevarse al esfuerzo. Cuando el fallo del VD no es capaz de mantener el GC en reposo, la presión pulmonar cae. Estos pacientes presentan disnea con sus actividades habituales o incluso de reposo (Nazzareno y cols., 2007). El colapso hemodinámico en este punto se debe a la interacción de varios factores. Justo antes del colapso hemodinámico, puede producirse un gasto cardíaco reducido como consecuencia de la interacción interventricular. A medida que el VD se dilata en respuesta a la sobrecarga de presión, la restricción del pericardio y de los haces de fibras musculares compartidas del VD y el VI restringen aún más la dilatación del VD y desplazan la relación presión-volumen diastólico del VD a una porción más curva, de modo que un aumento adicional de la presión del VD da como resultado menos estiramiento de la pared libre del VD y por lo tanto, menos reclutamiento de fibras mediante la relación Frank-Starling. Al mismo tiempo, el desplazamiento interventricular septal perjudica la expulsión del VI. Esta combinación resulta en una disminución neta en el gasto cardíaco (Greyson 2010).

7.3 Síntesis de dopamina y receptores dopaminérgicos en general

En las células dopaminérgicas la dopamina se sintetiza en el citoplasma a partir del aminoácido L-tirosina por la acción secuencial de 2 enzimas; la Tirosina Hidroxilasa (TH), que cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina utilizando oxígeno molecular como sustrato y tetrahidrobiopterina (BH₄) y Hierro como cofactores para generar L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina). La TH es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas y su actividad es altamente regulada por la concentración local de BH₄, productos y su estado de fosforilación (Fujisawa y col., 1987), (Zigmond y col., 1989). La segunda enzima, la L-DOPA descarboxilasa (DDC) cataliza la eliminación del grupo

carboxilo de la L-DOPA para generar dopamina. La alta actividad de esta enzima bajo condiciones normales produce que los niveles de L-DOPA intracelular sean prácticamente indetectables (Neff y col., 1995). La dopamina sintetizada puede ser liberada directamente al espacio extracelular o bien almacenada en vesículas por un transportador de monoaminas vesicular (VMAT), en donde puede alcanzar concentraciones extremadamente altas (0,5-0,6 M), esta acumulación facilita su liberación regulada a través de mecanismos de exocitosis dependiente de calcio (Bonisch y col., 1998). Una vez que la dopamina es liberada y ha actuado sobre sus receptores, su acción es terminada a través de 2 mecanismos; la receptación y el catabolismo. La receptación es el principal mecanismo y es realizada por un transportador de membrana de alta afinidad conocido como el Transportador de dopamina (DAT). El DAT recicla la dopamina a través de un cotransporte con 2 iones Na^+ y 1 de Cl^- . Alrededor del 70 al 80% de la dopamina liberada al espacio extracelular es inactivada por este proceso. La actividad del DAT puede ser modulada por segundos mensajeros como el diacilglicerol y el ácido araquidónico. Además, la actividad del DAT es inhibida por drogas como cocaína y anfetaminas generando un prolongado incremento de la dopamina extracelular y dando como resultado final un aumento de la señalización celular dopaminérgica (Blakely y col., 2000). El segundo mecanismo de término de acción de la dopamina es a través de su catabolismo por la acción de 2 enzimas llamadas Monoaminoxidasa (MAO) y la Catecol-Ometiltransferasa (COMT) para generar los metabolitos inactivos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), los que son posteriormente eliminados del organismo a través de la orina (Boulton y col., 1998).

Las acciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por cinco receptores distintos, pero estrechamente relacionados, estos receptores están acoplados a proteínas G (GPCR) y se dividen en dos grupos principales: las clases de receptores de dopamina: familia D1 (D_1 y D_5) y familia D2 (D_2 , D_3 , D_4 y D_5). Esta clasificación se basa generalmente en las observaciones bioquímicas originales que muestran que la dopamina es capaz de modular la actividad de la adenilatociclasa (AC); los receptores de la familia D1 activan a la AC para producir AMP cíclico mientras que los de la familia D2 inhiben a la AC para disminuir la producción de AMP cíclico.

7.4 Principales características de los receptores dopaminérgicos.

Los receptores de dopamina pertenecen a la familia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G (GPCR). Hasta el momento se han aislado, caracterizado y clonado cinco tipos de receptores de dopamina. De acuerdo a sus características farmacológicas los receptores se clasifican en dos grupos llamados D1 y D2 (D_{1-like} y D_{2-like}). Los receptores del grupo D1 están compuestos por los subtipos D₁ y D₅, estos se caracterizan por estar unidos a la proteína G_{αs} que estimula a la adenilatociclasa (AC) para producir el segundo mensajero AMPc. Los receptores del grupo D2 están formados por los subtipos D₂, D₃ y D₄, los que se caracterizan por estar unidos a la proteína G_{αi/o} que clásicamente inhiben la actividad de la AC evitando el aumento de AMPc (Missale y cols., 1998). Esta clasificación farmacológica fue propuesta en el año 1979 y se ha mantenido hasta nuestros días (Kebabian y col., 1979). Además de las diferencias farmacológicas, los receptores tipo D1 y D2 presentan importantes diferencias estructurales. A nivel de estructura proteica los receptores de dopamina tienen el amino terminal hacia la región extracelular y presentan varios potenciales sitios de N-glicosilación. El carboxilo terminal se localiza hacia el citoplasma y es cerca de siete veces más largo en los receptores tipo D1 que en los de tipo D2, es rico en residuos serina y treonina y contienen un residuo conservado de cisteína presente en todos los GPCR por el cual los receptores se anclan a la membrana plasmática vía palmitoilación (Lachowicz y col., 1997). Similar a otros GPCR, los receptores de dopamina tienen dos cisteínas localizadas en el primer y segundo lazo extracitoplasmático que forman un puente disulfuro que estabiliza la estructura terciaria del receptor (Fig. 1C), (Missale y col., 1998).

En el caso del tercer lazo intracitoplasmático, este es significativamente más largo para los receptores tipo D2, esta característica es común para los receptores que se acoplan a proteínas del tipo G_{αi/o}, mientras que los receptores de tipo D1 tienen un tercer lazo intracitoplasmático corto, que es característico de receptores acoplados a proteínas G_{αs} (Missale y col., 1998). En los receptores de dopamina, el tercer lazo intracitoplasmático corresponde al lugar donde se presenta la mayor variabilidad en la secuencia de aminoácidos, el cual puede ser responsable de sus respectivos sistemas de segundos mensajeros. En ambas familias, se han detectado sitios de fosforilación dentro del tercer lazo intracitoplasmático y

en el carboxilo terminal para quinasas reguladas por segundos mensajeros, como la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y proteínas quinasas de receptores unidos a proteína G (GRK). Estas señales pueden regular la desensibilización del receptor (desacoplamiento de la proteína G al receptor) o producir la internalización del receptor (por unión de moléculas tipo arrestina y endocitosis por vesículas de clatrina). Este último proceso puede ser revertido reciclando el receptor a la membrana o puede seguir la ruta de degradación por vía lisosomal (Namkung y col.,2004).

7.5 Dopamina y Receptores dopaminérgicos en el sistema cardiovascular

La dopamina no solo es un precursor de las catecolaminas noradrenalina y adrenalina, sino que también tiene acción como neurotransmisor independiente y hormona paracrina. Desempeña un papel importante en algunas patologías como la hipertensión y es un potente vasodilatador en muchas arterias sistémicas de mamíferos, lo que sugiere una fuente endógena de dopamina en la pared vascular.

En la arteria pulmonar y aorta se han encontrado concentraciones de dopamina, noradrenalina y adrenalina en la pared vascular, en donde en comparación con la noradrenalina y la adrenalina, los niveles de dopamina casi no se vieron afectados por la simpatectomía química, lo que indica que la fuente de dopamina no son los axones perivascuales simpáticos. Lo cual se ha demostrado por Sorriento y cols., 2012, en donde identificaron que las células endoteliales son una fuente de dopamina en la pared vascular, la síntesis es estimulada por un aumento en el AMPc intracelular el cual induce la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que es la enzima limitante de las catecolaminas (Lewis-Tuffin L. y cols., 2004). También cuando se trataron células endoteliales con el análogo de dibutiril-AMPc que es permeable a las células endoteliales en presencia del inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO) pargyline aumentó la concentración de dopamina intracelular y en el sobrenadante. Por lo tanto, las células endoteliales sintetizan y secretan dopamina de manera regulada (Edmonson y cols., 2004).

La acción de la DA en el sistema vascular periférico ejerce un efecto dual, similar a su efecto en corazón. La DA a dosis elevada, provoca vasoconstricción de la aorta, arterias

renales y coronarias, que conlleva a un aumento en la presión sanguínea (Hoffman y Lefkowitz, 1982). Se propone que este efecto es mediado por la activación de receptores α -adrenérgicos, (Goldberg y Rajfer, 1985). El uso de dosis bajas de dopamina, provoca una vasodilatación de arterias renales, coronarias, vasos mesentéricos y celíacos (Yatsu y Cols., 1997), lo que conlleva a una disminución de la presión sanguínea. Este efecto es mediado por la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂, presentes en estos vasos sanguíneos (Missale y Cols., 1988; Amenta y Cols., 1992; Ricci y Cols., 1994). Los receptores D₁, están localizados en el músculo vascular liso (postsinápticos), los cuales parecen mediar la relajación del músculo, y los receptores D₂ localizados en nervios simpáticos (presinápticos), que inhiben la liberación de NA (Francis, 1995). Se ha encontrado que la dopamina induce vasodilatación independiente de endotelio y es concentración dependiente en arterias mesentéricas de rata (Wanstall and O'Donnell 1989). Los receptores D₁ se localizan de manera postsináptica en la túnica media de las arterias sistémicas y al aumentar la actividad de la AC promueven la producción de AMPc y provocan vasodilatación directa. Los receptores D₂ como se asocian principalmente con uniones neuroefectoras simpáticas: la estimulación de estos receptores conduce indirectamente a la vasodilatación por inhibición del tono vasoconstrictor simpático. La localización de los receptores de dopamina vasculares ha sido ampliamente estudiada por inmunohistoquímica y se han localizado en los vasos sanguíneos piales, en las arterias renales y mesentéricas. En las arterias renales y mesentéricos se ha encontrado que expresan receptores de dopamina postsinápticos de la familia D₁ (receptores D₁ y D₅) y presinápticos D₂ (D₂, D₃ y D₄) (Zeng y cols., 2007).

Estudios previos en el laboratorio mostraron la presencia de los receptores dopaminérgicos D₂ y D₃ en el ventrículo derecho e izquierdo del corazón de cobayo, además de que la estimulación de ambos receptores producía un efecto cronotrópico e inotrópico negativo, evaluado en corazón aislado (Gómez Villalobos M. y cols., 2002), además de que en la preparación de músculo papilar se encontró que los receptores de la familia D₂, pero especialmente el subtipo D₄ se encontraba sobre expresado en el corazón de ratas con hipertensión espontánea (datos no publicados).

7.6 Dopamina y receptores dopaminérgicos en la circulación pulmonar normal

7.6.1 Efecto funcional de la dopamina en la circulación pulmonar

La evidencia experimental sugiere que la dopamina (DA) tiene un papel importante en la regulación de la circulación pulmonar. De hecho, se han encontrado concentraciones apreciables de dopamina (200 ng/g) en las arterias pulmonares de conejo (Umaki y cols., 1987, Kobayashi y cols., 1995). En rata se encontraron concentraciones de DA en arterias pulmonares intra y extra pulmonares de 1.9 y 1.8 nmol/g respectivamente, en humanos se han cuantificado concentraciones de DA en arterias pulmonares de grande y mediano calibre (0.02 y 0.03 nmol/g respectivamente) (Kobayashi y cols., 1995).

Es por eso que en algunos experimentos se ha estudiado el efecto funcional de la dopamina en la circulación pulmonar. Harrison D. y cols., 1969. encontró que la infusión de dopamina a dosis de 25 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por min induce aumento de la presión media pulmonar pero no induce cambios en la resistencia vascular pulmonar en perros. En otro estudio la infusión de DA a 32 $\text{mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en lechones produce aumento de la presión de la arteria pulmonar y de la resistencia vascular pulmonar (Cheung y Barrington 2005).

También la dopamina administrada por vía intravenosa a una tasa de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ se observó la disminución de la resistencia vascular pulmonar, lo que sugiere un efecto vasodilatador pulmonar (Philip-Joet y cols., 1988).

En estudios de reactividad vascular la dopamina produce relajación dosis dependiente en anillos intactos de la arteria pulmonar de conejo y en los anillos sin endotelio de la arteria pulmonar de conejo se redujo a aproximadamente 40% en comparación con los anillos intactos. La apomorfina, como agonista de los receptores dopaminérgicos D2 causó relajación dependiente de la concentración en los anillos con endotelio de arteria pulmonar. También la bromocriptina, otro agonista dopaminérgicos D2 produjo una ligera relajación en esta arteria a concentraciones altas (Yamauchi y cols., 1992).

La DA induce relajación dosis dependiente en arteria pulmonar de conejo (Mori y cols., 1988). En la arteria pulmonar de conejo precontraída con prostaglandina F₂ la dopamina produce una relajación dependiente de la concentración y en este mismo estudio el SKF38393, un agonista del receptor de dopamina D₁ imitó parcialmente la curva concentración-respuesta para la dopamina (Hoshino y cols., 1986; Mori y cols., 1988)

La dopamina a dosis que van de 0.1 a 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ administrada en pulmones aislados de hurones sometidos a vasoconstricción por hipoxia genera una disminución de la presión pulmonar y también la estimulación selectiva del receptor D1 con su agonista SK&F 38393 ocasiona disminución de la presión pulmonar (Gorman 1988).

El antagonista de los receptores D1 el SCH 23390, infundido 2,5 pg / kg.min-I en corderos causo aumento de la presión arterial pulmonar y el Fenoldopam (Agonista selectivo de los receptores D1), infundido a la dosis de 60 pg / kg causo disminución de la presión pulmonar en corderos (Polak y Drumond 1993).

En estudios en humanos la dopamina ejerce relajación dosis dependiente en anillos precontraídos con prostaglandina F2. La relajación inducida por la dopamina fue inhibida por haloperidol y flufenazina, pero no por la domperidona, lo que sugiere que esta relajación fue mediada a través de receptores D1 (Yamauchi y cols., 1989).

Por otro lado, la administración intravenosa de fenoldopam (agonista del receptor D₁) en hombres a una dosis 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ produjo una disminución de la resistencia vascular pulmonar sin cambios en la función ventricular derecha (Gombotz y cols., 1998).

El fenoldopam un agonista selectivo del receptor D1 se encontró que produce relajación de la arteria pulmonar de humanos (Hughes y Sever 1989)

7.6.2 Receptores dopaminérgicos en la circulación pulmonar

Mediante estudios de autoradiografía se ha encontrado la presencia de receptores de DA D1 y D2 en la vasculatura pulmonar en humanos (Ricci y cols., 1992, Jin y cols., 1995) y conejo (Bruzzone y cols., 2002). El receptor de DA D5 se expresa en la túnica media de las arterias en la circulación pulmonar (Kobayashi y cols., 1995). Kim y cols., 1999 encontraron la expresión del RNAm para los receptores de la familia D1 en la túnica adventicia, media e íntima. En arteria pulmonar de conejo la dopamina a dosis nanomolares y micromolares produce relajación dependiente de la concentración y el SKF38393, un agonista para el receptor D₁ de dopamina imitaba parcialmente la curva de concentración-respuesta para la dopamina lo que sugiere la presencia de este receptor en este lecho vascular.

Se han propuesto varios mecanismos debido a que existe evidencia experimental que sugiere un papel importante de la dopamina en la regulación de la circulación pulmonar ya que se han encontrado altas concentraciones de la dopamina en la arteria pulmonar de conejo;

la estimulación del receptor D₁ ubicados tanto en el endotelio y musculo liso produce relajación en arteria pulmonar de humano y de conejo (Yamauchi y cols., 1992).

Recientemente Ricci y cols., 2006 demostraron que la arteria pulmonar de humanos expresa los subtipos de los receptores de DA D₁, D₂, D₄ y D₅. Los receptores D₁ y D₅ se expresan principalmente en el endotelio de las ramas extrapulmonares y en la arteria pulmonar. Mientras que los receptores D₂ y D₄ estaban más expresados en la túnica media y adventicia en toda la arteria pulmonar.

Por estudios de hibridación in situ se ha demostrado la presencia de RNAm para el receptor D₂ en la túnica íntima y RNAm para el receptor D₁ en la túnica media, adventicia e íntima (Kim y cols., 1999).

7.6.3 Participación de los receptores dopaminérgicos en la hipertensión pulmonar

La DA puede reducir el tono vascular pulmonar y así disminuir la hipertensión pulmonar (Gorman y cols., 1988). Esto se ha demostrado en pacientes con EPOC (Philip-Joet y cols., 1999). Otros estudios han mostrado que la administración de dopamina en pacientes con hipertensión pulmonar produce una disminución significativa de la resistencia vascular sistémica pero no ocasiona cambios significativos en la resistencia vascular pulmonar (Holloway y cols., 1975), sin embargo en un modelo agudo de hipertensión pulmonar en rata la infusión de dopamina si disminuye la resistencia vascular pulmonar. En un modelo de hipertensión pulmonar en perros la administración de DA fue beneficiosa ya que disminuye la resistencia vascular pulmonar y mejora la ventilación pulmonar (Ducas y cols., 1992). En un modelo de HP en perros en donde existe insuficiencia ventricular derecha la DA administrada a 2 a 4 L / min / m² produce aumento de la presión pulmonar (Akagi y cols., 2014).

En el modelo de HP por monocrotalin la DA disminuye la presión de ventrículo derecho (Piao y cols., 2012).

Se midió la extracción pulmonar neta de dopamina en humanos sin hipertensión pulmonar y pacientes con hipertensión pulmonar primaria o secundaria y lo que se encontró fueron valores de 51 pg/ml para el grupo de control y los valores fueron similares en pacientes con hipertensión pulmonar (Sole Y cols., 1979).

Los estudios de la dopamina en el tratamiento de la hipertensión pulmonar se han centrado principalmente en la participación de la dopamina como terapia de sostén de otros tratamientos para la hipertensión pulmonar (análogos de las prostaciclina, antagonistas de la fosfodiesterasa 5, antagonistas del receptor de endotelina, etc) que producen hipotensión sistémica, ya que la dopamina al tener efecto dual a dosis altas tiene un efecto de aumento de la presión arterial sistémica contrarrestando la baja de presión, sin embargo son pocos los estudios que abordan a la dopamina como un posible tratamiento de la hipertensión pulmonar. Dadas las evidencias que existen acerca de la importante función que tiene la dopamina y los agonistas específicos de la dopamina sobre la circulación pulmonar en condiciones normales es importante centrar las investigaciones en el estudio de la dopamina y los agonistas específicos de los receptores dopaminérgicos en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

8 Justificación

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad grave con un mal pronóstico. En los pacientes no tratados, hay un aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar que conduce a fracaso ventricular derecho intratable y muerte prematura. El período mediano de supervivencia después del diagnóstico es de aproximadamente 2-3 años. A pesar de las grandes mejoras recientes en los tratamientos sintomáticos, ningún tratamiento actual cura esta condición devastadora. Por lo tanto, es deseable una nueva estrategia terapéutica para la hipertensión pulmonar. En este mismo sentido existe evidencia de la presencia de neurotransmisión dopaminérgica en el circuito vascular pulmonar, ya que se han cuantificado niveles elevados de dopamina en vasos pulmonares, así como se ha demostrado la presencia y/o expresión de receptores dopaminérgicos de la familia D2 en células endoteliales y vasculares de arterias pulmonares, sin embargo, se desconoce si están alterados en la HAP. Por lo anterior en este trabajo nos proponemos investigar la participación de la neurotransmisión dopaminérgica en el desarrollo de la HAP, a través de evaluar la expresión de receptores dopaminérgicos en arterias pulmonares de ratas con HAP experimental y de evaluar el efecto fisiológico en la reactividad vascular, así como la generación de ON, de agonistas dopaminérgicos selectivos (familia D2), en arterias pulmonares de animales con HAP experimental. Esto nos permitiría conocer la participación de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos en procesos fisiopatológicos como la hipertensión pulmonar y así poder proponer una posible terapéutica para la hipertensión pulmonar basada en el uso de agonistas de receptores dopaminérgicos específicos.

9 Hipótesis

Existe una alteración en la densidad de los receptores dopaminérgicos en las arterias pulmonares de ratas con hipertensión arterial pulmonar espontánea y por monocrotalina, lo que está asociado a una mayor alteración en la regulación vascular del circuito pulmonar.

10 Objetivos

10.1 Objetivo general

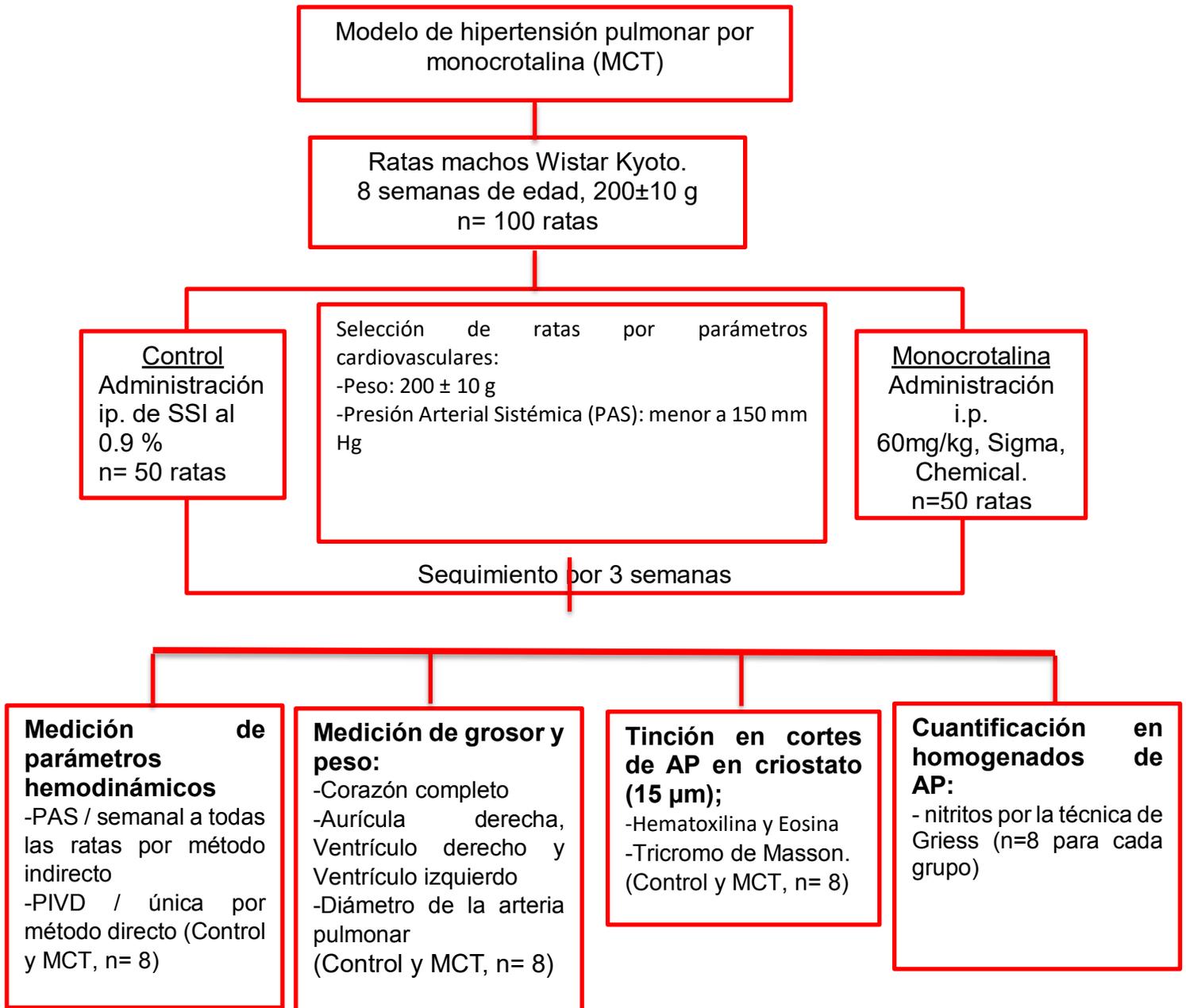
Evaluar el efecto sobre la reactividad vascular de los agonistas específicos para cada subtipo de receptor dopaminérgico de la familia D2 (D₂, D₃ y D₄) en arterias pulmonares de ratas con hipertensión arterial pulmonar espontánea y por monocrotalina.

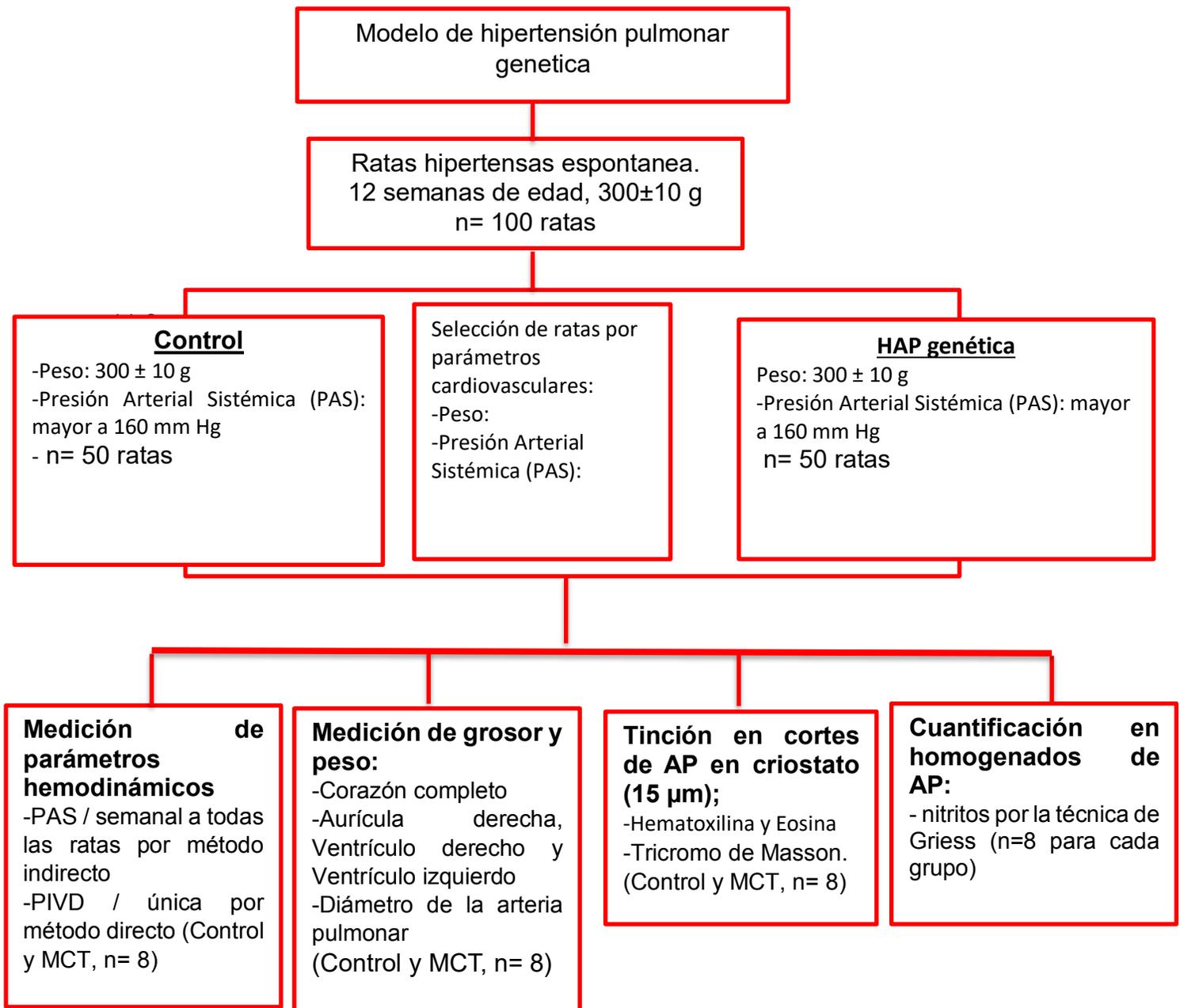
10.1.1 Objetivo particulares

1. Evaluar en el modelo de órgano aislado el efecto fisiológico de la activación de receptores dopaminérgicos D2 con agonistas específicos en arteria pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar espontánea e inducida por monocrotalina.
2. Cuantificar los niveles de NO₂ en homogenados de arteria pulmonar de ratas control y con hipertensión pulmonar espontánea e inducida por monocrotalina.
3. Caracterización histológica de los cambios estructurales de la arteria pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar genética e inducida por monocrotalina.

11 Materiales y métodos

11.1 Diagrama de trabajo





11.10 Animales

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa Wistar Kyoto (WKY) e Hipertensa espontanea (SH) con un peso corporal de 200 ± 20 g. Todos los cuidados de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la "Norma Mexicana 062." Los animales se alojaron en un ambiente de temperatura y humedad controladas con un ciclo de 12 h luz: 12 h oscuridad con acceso libre a comida y agua. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar tanto el número de animales utilizados, así como el estrés y malestar que pudieran experimentar los animales durante los procedimientos experimentales.

Reactivos y fármacos utilizados

Reactivos

NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), KCl (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), $MgSO_4$, KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), $NaHCO_3$ (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Glucosa (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), $CaCl_2$ (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Azul de anilina (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Rojo de Ponceau (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Hematoxilina de Weigert (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Acido fosfomolibdico (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), $NaNO_2$, Sulfanilamida (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), NED (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.).

Fármacos

Apomorfina (Tocris, Cookson Inc, Ellisville, MO), Fenilefrina (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Acetilcolina (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), SKF-38393 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), Quinpirole (Tocris, Cookson Inc, Ellisville, MO), 7-OH-DPAT (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.), PD 168077 (Tocris, Cookson Inc, Ellisville, MO) y Monocrotalina (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.).

11.10.1 Inducción de hipertensión pulmonar con monocrotalina

Se utilizaron un total de 100 ratas de la cepa Wistar Kyoto con un peso 200 ± 10 g, de las cuales aleatoriamente 50 integraron el grupo problema, al cual se administró bajo inyección intraperitoneal una dosis única de 60 mg/kg de peso de monocrotalina (MCT) (Sigma-Aldrich EUA) preparado de la siguiente manera: la dosis calculada para cada rata se

disolvió en 1 N de HCl enseguida se neutralizó agregando 1N NaOH y se aforó a 0.3 ml con solución salina isotónica al 0.9% que es el volumen de administración. El siguiente grupo de ratas constituyó el grupo control que recibió un volumen de vehículo (S.S.I. al 0.9%) en la misma cantidad.

Se realizó un seguimiento de 3 semanas a cada grupo, durante las cuales cada grupo se les realizó control de peso y de presión arterial sistémica no invasiva semanalmente.

11.10.2 Modelo de hipertensión pulmonar genética.

La rata hipertensa espontánea (SH) genera en un alto porcentaje hipertensión pulmonar de forma espontánea (SH con HAP genética), se utilizarán ratas macho SH con HAP genética (grupo problema) y machos WKY (grupo control).

Parámetros de inclusión: valores de presión de ventrículo derecho (mayor de 25 mm Hg), que existiera hipertrofia de ventrículo derecho (peso de ventrículo derecho mayor de 300 mg y espesor de la pared libre de ventrículo derecho mayor o igual a 2 mm) y dilatación del tronco de la arteria pulmonar (diámetro mayor a 2 mm). Mientras que se considerara como grupo control WKY a las ratas que presenten valores de presión de ventrículo derecho (menor de 25 mm Hg). Además de confirmar al momento del sacrificio de la rata que no exista hipertrofia de ventrículo derecho (peso de ventrículo derecho menor de 300 mg y espesor de la pared libre de ventrículo derecho menor a 2 mm) y que no exista dilatación del tronco de la arteria pulmonar (diámetro menor a 2 mm).

11.10.3 Mediciones de presión en el ventrículo derecho.

El equipo que se utilizó para la medición consta de un transductor de presión Grass PX-23 que se conecta con un catéter de registro de presión intracavitaria (catéter para arteria umbilical Argyle™ 1.16 mm de diámetro) y una vez que censa los cambios de presión envía la señal de registro al Polígrafo Grass 790 y a través de una tarjeta de adquisición de datos PicoTechnology™ ADC II transfiere la información a la computadora en la cual podemos observar los registros con el software PicoScope™. El procedimiento quirúrgico para el registro in vivo se realizó siempre previa comprobación de una correcta calibración en los equipos de medición, la cual se realiza de la siguiente forma: Calibración del polígrafo Grass 790: se introduce solución salina al transductor de presión para limpiarlo evitando la formación de burbujas de aire, después mediante una llave de 3 vías en la entrada que va conectada directamente hacia la sonda de registro intracardiaco se coloca el tubo de insuflación de un baumanómetro aneroide, al tiempo que se observa el monitor de la computadora que mediante el software PicoScope nos muestra un registro de la presión medida, que en este momento debe ser igual a cero. En seguida se insufla el baumanómetro a 100mmHg y se corrobora que la línea basal mostrada en la pantalla se desplace 250 mV. Teniendo en cuenta que 100mm Hg equivalen a 250 mV

Cumplidas las 3 semanas de evolución de la hipertensión pulmonar para el caso del grupo de hipertensión pulmonar inducida y para los demás grupos antes del sacrificio a los sujetos de experimentación se les midió la presión sistólica del ventrículo derecho por un método directo.

La presión sistólica del ventrículo derecho, se analizó en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y con tórax cerrado, se diseco la región cervical lateral derecha y a nivel superficial para encontrar y separar la vena yugular externa derecha del tejido conectivo utilizando pinzas de disección e hisopos humedecidos en solución salina, tratando en lo posible no manipular demasiado el tejido para evitar que colapse el vaso. Una vez disecada la vena en una extensión de 1 cm aproximadamente, se liga en sus dos extremos, cefálico y caudal con un hilo de seda, en el extremo cefálico se ata con un nudo ocluyendo totalmente la circulación y en el extremo caudal se realiza un nudo sin sujetar demasiado para permitir que penetre el catéter de registro intracavitario. Al tener el vaso ligado por los dos extremos, con una pinza oftalmológica se suspende a la mitad de los extremos ligados para

cortar con la tijera oftalmológica una extensión no mayor de 1/3 de la circunferencia del vaso. Luego se conectó el catéter de registro de presión intracavitaria a una llave de tres vías la cual tiene una vía de acceso a la sonda de medición del transductor de presión y otra conectada a una jeringa para insulina con solución salina 0.9% más heparina, teniendo precaución de que esté cerrada hacia el catéter, se confirma entonces la permeabilidad del mismo y se insertó en el orificio del vaso sanguíneo con la curva en posición ventral removiendo la ligadura caudal y lentamente se introdujo hasta la marca con el número 5 (5 cm) y se giró 90° medialmente con el fin de que no se siga hacia la vena cava inferior. Una vez posicionado el catéter de registro de presión intracavitaria se realizó una ligera succión con la jeringa para insulina para corroborar que está permeable, si hay sangre que fluye por dentro se conecta el transductor de presión y abre esta vía, inmediatamente vimos los trazos de presión característicos de presión en ventrículo derecho. Una vez conseguido el trazo de presión deseado se esperamos 5 minutos para estabilización de parámetros hemodinámicos y guardamos los archivos de registro en la computadora,

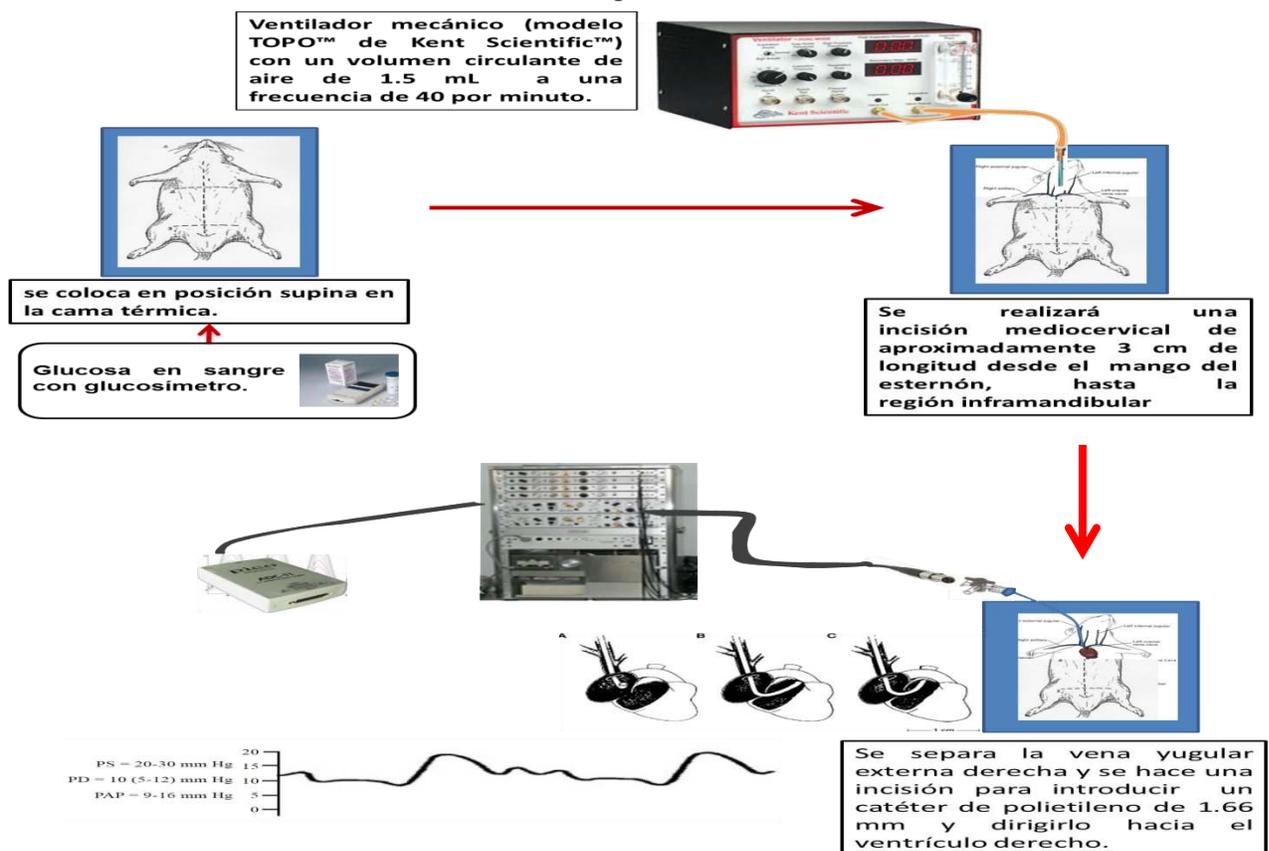


Figura 8.-Diagrama que indica los pasos a seguir para la determinación de la presión intraventricular derecha.

11.10.4 Estudios in vitro de arteria pulmonar aisladas

Después de 3 semanas de la inducción de hipertensión pulmonar se disecaron los anillos del tronco de la arteria pulmonar de ~ 3 mm de longitud de las ratas control, con hipertensión pulmonar genética e hipertensión pulmonar inducida con monocrotalina. Estos anillos se colocaron inmediatamente en solución fría de Krebs-Henseleit oxigenada. Para obtener anillos sin endotelio, se froto el interior de la superficie de la luz vascular con una varilla de acero quirúrgico para remover el endotelio. Los anillos de aorta torácica y de arteria pulmonar con y sin endotelio se montaron entre dos ganchos de acero inoxidable en baños de órganos de 10 ml de volumen y llenos con solución de Krebs-Henseleit (37 °C; 95% de O₂ y 5% de CO₂). Uno de los ganchos de acero se anclo en la cámara y el otro se conectó a un transductor de fuerza (modelo FT.03, Grass InstrumentCo. Quincy, Mass.). Para poder ver el registro de tensión en tiempo real se utilizó el programa pico Log recorder (pico technology Ltd, united kingdom).

11.10.5 Evaluación de viabilidad vascular

Los anillos se colocaron bajo una tensión de reposo de 2g. La presencia de endotelio funcional se evaluó por la capacidad de la acetilcolina (ACh, 10⁻⁶ M) para inducir más del 60% de relajación de los anillos respecto a la máxima contracción con fenilefrina (PE, 10⁻⁶ M) y se consideraron anillos sin endotelio si la relajación inducida con ACh es inferior al 20% respecto a la máxima contracción con PE.

Después de que se realizó la evaluación del endotelio funcional se realizaron tres lavados con Krebs-Henseleit a los anillos de aorta torácica y arteria pulmonar con y sin endotelio para permitir el retorno al tono vascular basal. Una vez que se estabilizaron nuevamente los anillos se continuaron con la ejecución de los siguientes protocolos:

11.10.6 Efecto de agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos

Para los agonistas dopaminérgicos se realizaron curvas concentración respuesta acumulativa en concentraciones de 1nM-10µM. mientras que para el estudio del efecto de agonistas más antagonistas se incubaron primero el tejido con el antagonista durante 15 minutos a una concentración de 1 µM y posteriormente se realizaron las curvas

concentración respuesta acumulativa en concentraciones de 1nM-10µM para el agonista respectivo.

En la siguiente tabla se presentan a los agonistas y antagonistas que se utilizaron en los estudios de reactividad vascular.

Tabla 3. Kd y Ki de agonistas de receptores dopaminergicos utilizados en este estudio.

Fármaco	Receptor	Kd		Antagonista	Ki	
Apomorfin	D2-like					
SKF-38393	D ₁	6 nM en cultivo de células de músculo liso de arterias mesentéricas	Hall A. y cols., 1993	SCH-23390	2.05 nM en arteria pulmonar de conejo	Kobshasi Y. y cols., 1995
Quinpirol	D ₂	Ki: 98 nM en corazón de humano	Ricci A. y cols., 1997	Raclopride	<5 fmol/L En arteria coronaria de rata	Cavallotti C. y cols., 2002)
7-OH-DPAT	D ₃	0.43 nM En células mononucleares de humano.	Ricci A. y cols., 1997	U-99194A	36 nM En cerebro de rata	PierceyM.y cols., 1996
PD 168077	D ₄	8.7 nM en cerebro de rata	Fabricio S. y cols., 2011	L-750	10 nM en cerebro de rata	Fabricio S. y cols., 2011

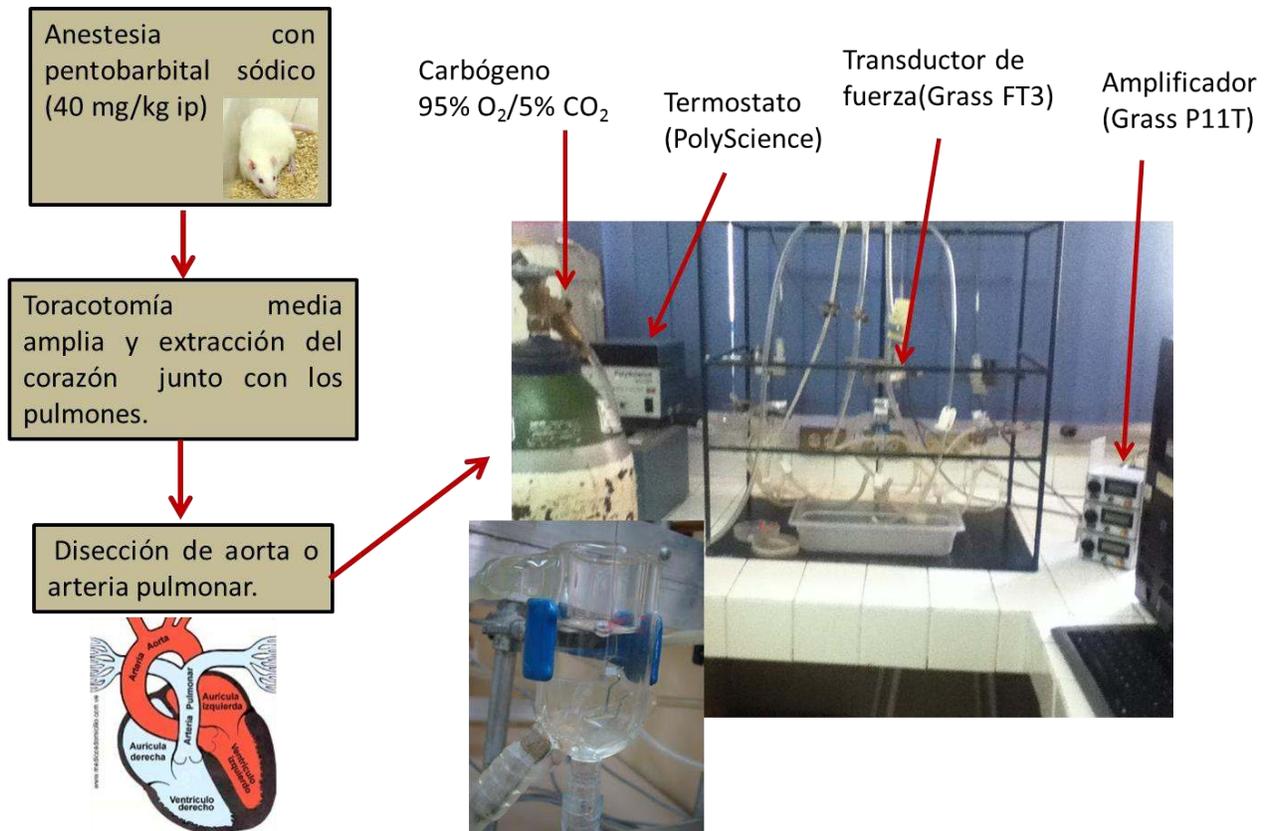


Figura 9.-Diagrama que indica los pasos a seguir para la evaluación de la reactividad vascular en anillos de aorta.

11.11 Estudios bioquímicos

11.11.1 11.6.1 Determinación de NO₂ en arteria pulmonar.

Los NO₂ se cuantificaron por una técnica espectrofotométrica (micro técnica) basada en la reacción de Griess.

Fundamento de la reacción de griess.

La reacción de Griess es una técnica que nos ayuda a investigar la formación de óxido nítrico (ON) en muestras biológicas a partir de la determinación de nitritos (NO₂⁻). En condiciones fisiológicas in vitro e in vivo, cuando el radical superóxido (O₂⁻) está en concentraciones bajas, el NO reacciona con el oxígeno (O₂) para formar nitritos (NO₂⁻). Estos NO₂⁻ se pueden determinar por espectrofotometría y son un índice confiable de la producción

de ON en una gran variedad de líquidos y tejidos biológicos (plasma, suero, orina y tejido cardíaco, entre otros). La técnica de Griess se basa en la reacción de diazotización entre el reactivo de Griess [sulfanilamida y dicloruro de N-1- nafiletilediamina (NED)] en condiciones ácidas (ácido fosfórico)] y los nitritos. En esta reacción se obtiene un compuesto de color rosa, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de nitritos. La sensibilidad del método varía y su límite de detección es de 2.5 μM de nitrito.

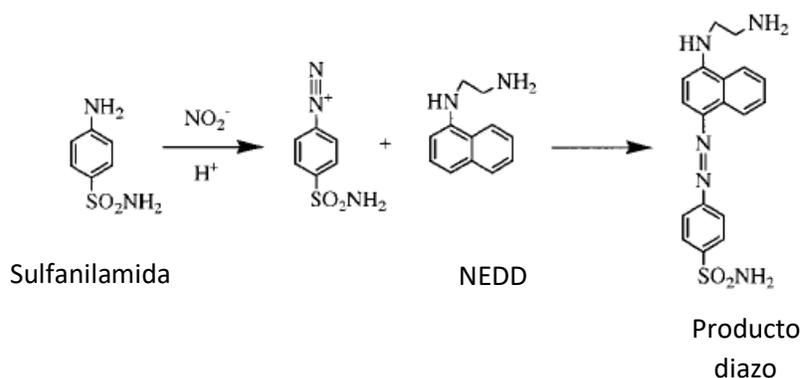


Figura 10. Esquema de la reacción de Griess para la determinación de nitritos.

11.12 Preparación del homogenado de arteria pulmonar

- 1.- Los anillos de arteria pulmonar se colocaron en 2 ml de buffer de fosfatos (pH 7.4), con tijeras se fragmentará la AP para posteriormente se homogenizaron los tejidos por separado en un homogeneizador 10 segundos/3 ocasiones a máxima velocidad (3000 rpm).
- 2.- Después las preparaciones se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante y se desechó la pastilla.
- 3.- El sobrenadante se filtró y centrifugo a 20 000 rpm por 20 minutos a 4°C. La pastilla que se obtuvo se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfatos y se centrifugo nuevamente a 20 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- 4.- El botón se utilizó para la cuantificación NO_2 por el método de griess.

Método para determinar nitritos.

El reactivo de Griess se preparó mezclando los siguientes reactivos:

- 1.- Dicloruro de N-1- nafiletilenediamina al 0.1% (NED): 10 mg
- 2.- Sulfanilamida al 1%: 100 mg
- 3.- Disuelto y aforado a 10 ml con ácido fosfórico (H₃PO₄) al 5 % en agua electropura.

Se utilizó nitrito de sodio al [0.1 M] (para elaborar una curva de calibración) la cual debe de tener un rango de concentraciones mayor a los nitritos en las muestras, para este caso va de 0 a 50 μ M (0, 0.75, 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50 μ M)

Se utilizó una placa de 96 pozos y los reactivos, se adicionaron a cada pozo en volúmenes iguales (100 μ L) de la siguiente manera:

- 1.- 100 μ L de muestras homogeneizadas.
- 2.- 100 μ L de reactivo de Griess.

Las muestras se trabajaron por duplicado y se leyeron a una longitud de onda de 540 nm. Las concentraciones de NO₂ se obtuvieron al extrapolar los datos de absorbancia con la curva de calibración.

11.13 Análisis histológico de la arteria pulmonar

11.13.1 Sacrificio y obtención de la muestra

Para el estudio histológico se sacrificaron 4 animales de cada grupo, se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg ip, después se realizó toracotomía media para obtener el corazón junto con la aorta y la arteria pulmonar, posteriormente se hizo un corte transversal en la región aurícula-ventricular para la arteria pulmonar, éstas se colocaron en solución de Krebs-Henseleit frío para quitar el exceso de sangre, inmediatamente después se congelaron sumergiendo durante 30 segundos los tejidos en 2-butanol (SIGMA Aldrich) y un *pellet* de hielo seco se le colocó para congelar, posteriormente se guardaron en un refrigerador a una temperatura de menos 70 °C para su corte posterior.

11.13.1.1 Corte en criostato de las muestras

Se empleó un criostato digital para realizar los cortes del tejido vascular cardíaco. Las muestras se situaron en el criostato, fijándolas a la platina por la parte basal para que la

arteria pulmonar quede perpendiculares a la platina, enfriado previamente a una temperatura menor a 20 °C y se hicieron cortes transversales seriados de 20 µm de espesor. Las secciones se adhirieron a portaobjetos gelatinizados para asegurar un anclaje correcto de las mismas durante todo el proceso histoquímico, los cortes se fijaron al porta objetos gracias a la diferencia de temperatura que existe entre el interior del criostato y el portaobjetos.

11.13.1.2 Tinción de Hematoxilina y Eosina

La tinción de hematoxilina y eosina (H&E) es una técnica cuyo fundamento radica en las propiedades ácido-base de la célula. La hematoxilina es un colorante de carácter básico que tiñe al núcleo, mientras que la eosina tiñe al citoplasma por sus características ácidas. La técnica de H&E se utiliza para observar de forma general la morfología de las células y determinar si existen alteraciones de acuerdo a las características ácido-base de las células.

El desarrollo de la técnica, consistió en teñir con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, para después lavar con agua corriente durante uno y medio minutos y posteriormente teñir con eosina por 5 segundos. Las muestras se deshidrataron colocándolas durante un minuto en etanol al 50, 70, 95 % y 10 minutos en alcohol al 100% y se sometieron a un proceso de aclaración con xilol durante 15 minutos. Posteriormente se realizó el montaje utilizando resina sintética, se dejan secar para su análisis posterior y toma de imágenes utilizando un microscopio Leica y una cámara para adquisición de imágenes, las cuales se analizaron mediante el programa. Los resultados mostraron a los núcleos celulares teñidos de color azul y el citoplasma de color rojo o rosado.

11.13.1.3 Tinción tricromo de Masson

El tejido conjuntivo se caracteriza por presentar diferentes componentes como son células, matriz intercelular que también puede designarse material extracelular o sustancia fundamental y líquido tisular. La riqueza de su material intercelular es una de sus características predominantes, el cual está formado por la denominada sustancia forme, integrada por fibras colágenas, elásticas y reticulares y la sustancia amorfa compuesta por glicoproteínas. Para el estudio del tejido conjuntivo e identificación de algunos de sus componentes se utilizan diversos tipos de técnicas de tinción, entre estas se encuentran las denominadas tricrómicas (el nombre es debido a que se ocupan tres tipos de colorantes), las

cuales se emplean para diferenciar a las fibras colágenas y al tejido muscular o para identificar el aumento en la cantidad de fibras colágenas en algunas enfermedades.

Una de las técnicas tricrómicas para identificar a las fibras colágenas es la técnica de Masson, en donde se utiliza un colorante básico como la Hematoxilina Férrica de Weigert para diferenciar a los núcleos, después se procede a colorear con un colorante ácido, el rojo de Ponceau, que se une a todos los elementos acidofílicos del tejido, como son: el citoplasma, el músculo y la colágena, posteriormente se continúa colocando a los cortes en una solución de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico lo que provoca que las fibras colágenas se decoloren y los grupos ácidos de estos actúan como un sistema de unión que favorecen que el colorante azul de anilina o verde luz, tengan mayor afinidad por las fibras colágenas.

12 Análisis de resultados

1. En los estudios de parámetros hemodinámicos y estudios bioquímicos se graficará la media \pm EEM
2. En los estudios de reactividad vascular los resultados serán presentados en valores porcentuales y se graficará la media \pm EEM.

Los resultados se analizaron con una ANOVA de una y dos vías con medidas repetidas, si existe diferencia significativa se realizará el pos hoc Tukey considerando diferencia significativa con una $p < 0.05$.

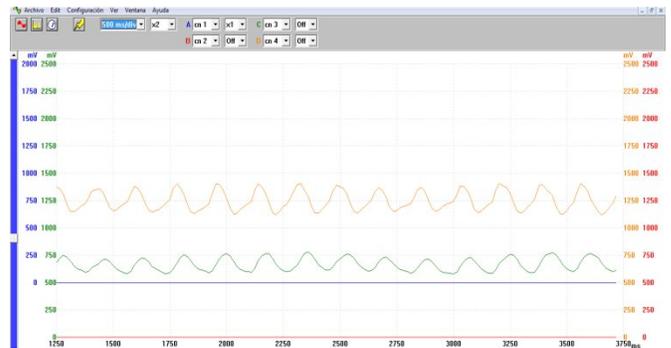
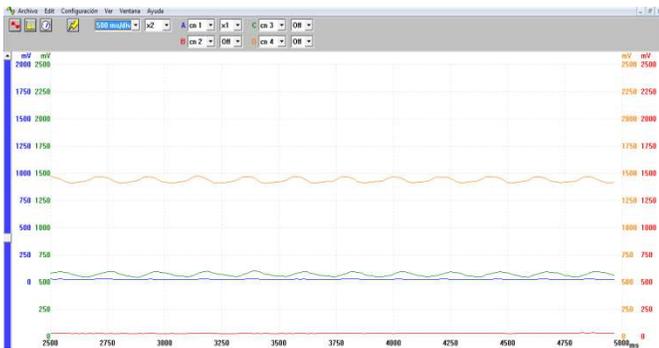
13 Resultados

Para seleccionar a las ratas que fueron al grupo de HAP espontánea y su control se hizo midiendo el espesor y el peso del ventrículo derecho (VD) y el diámetro de la arteria pulmonar (AÑ), estos valores se tomaron al momento del sacrificio de las ratas que se utilizaron para realizar reactividad vascular.

En las ratas con HAP Espontanea y por MCT se incrementa el espesor de VD y el diámetro de la AP comparada con ratas con presión de VD normal, como se representa en el panel de fotos de la figura 6.

a)

b)



Control

HAP-Espontanea

HAP-MCT

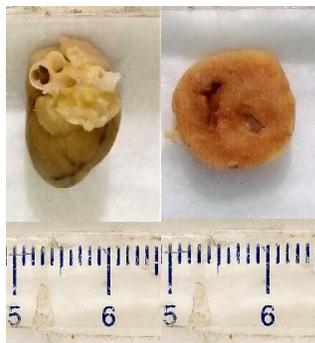
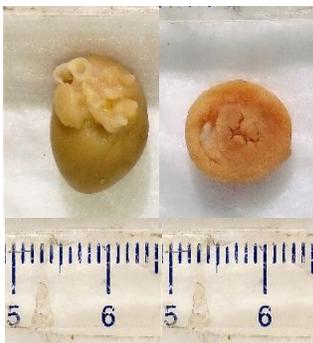


Figura 11. Se muestra la correlación entre la presión de ventrículo derecho (PVD) y la estructura anatómica macroscópica del corazón en condiciones de ventrículo derecho normal (grupo control) en a) y en condiciones de hipertrofia ventricular derecha (HAP-Espontanea) en b). Control (n=28), con HAP-Espontanea (n=28) y HAP por MCT (n=28).

Tabla 4. Parámetros generales.

Grupo	Peso corporal (g)	Peso corporal al sacrificio (g)	PSVD (mm Hg)	Peso de corazón (g)	Peso Corazon/peso corporal (g/g)	Peso VD (g)	Peso VD/Peso Corazon (g/g)	Espesor VD	Diámetro de AP (mm)
Control-WKY	213±3.1	411±13.3	23±0.21	1.05±0.04	0.25±0.06	0.232±10	22.8±0.75	1.97±0.08	1.95±0.038
SH-HAP-Genética	184±2.7**	352±17.5*	43±1***	1.45±0.04*	0.41±0.010**	0.456±17**	31.4±1.1**	2.9±0.1*	2.7±0.5***
WKY-SSI	200±6.5	249±4.6	26±0.67	0.9 ±0.03	0.36±0.02	0.215±9	23.8±2.4	1.8±0.9	1.9±0.12
WKY-Monocrotalina	199±4.0	204±7***	62 ±3.02	1.12 ±0.08*	0.54±0.01**	0.298±0.12*	26.6±1.3*	3.2±0.11***	3.9±0.09**

PSVD: Presión sistólica de ventrículo derecho, VD: Ventrículo derecho, AP: Arteria pulmonar, SH: Hipertensa espontanea, WKY: WistarKyoto, HAP: Hipertensión arterial pulmonar y MCT: Monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=28 para cada grupo.

13.1 Peso corporal

Analizando el peso corporal en los cuatro grupos experimentales podemos observar que las ratas del grupo SH-HAP-Espontanea gana menos peso que su control durante un período de 4 semanas (WKY-Control: 411 ± 3.1 g vs SH-HAP-Espontanea: 352 ± 17.5 g, $p < 0.05$). Además de que el grupo administrado con MCT muestra un retraso de crecimiento pronunciado, dando como resultado un peso corporal significativamente menor que su control (WKY-SSI: 249 ± 4.6 g vs WKY-MCT: 204 ± 7 g, $p < 0.001$), esta no ganancia de peso en las ratas WKY-MCT podría ser un signo de insuficiencia cardíaca comparable a la caquexia en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, que estaría relacionado con la alta mortalidad que se presenta en estas ratas.

13.2 Peso de corazón

El peso del corazón de las ratas con HAP espontánea y por MCT es mayor en comparación con sus respectivos controles (WKY-Control: 1.05 ± 0.04 g vs SH-HAP-Espontanea: 1.45 ± 0.04 g, $p < 0.05$) y (WKY-SSI: 0.9 ± 0.03 g VS WKY-MCT: 1.12 ± 0.08 g, $p < 0.05$). Sin embargo, el peso del corazón del grupo administrado con MCT es menor en comparación con el SH-HAP-Espontanea (SH-HAP-Espontanea: 1.45 ± 0.04 g vs WKY-MCT: 1.12 ± 0.08 g, $p < 0.001$) (Tabla 4).

El peso del corazón está relacionado directamente con el peso corporal por lo cual en la figura b se muestra la relación peso corazón/peso corporal, en donde podemos observar que tanto el grupo SH-HAP-Espontanea y WKY-HAP-MCT presentan un aumento en esta relación cuando se comparan con sus respectivos controles; (WKY-Control: 0.25 ± 0.06 g/g vs SH-HAP-Espontanea: 0.41 ± 0.010 g/g, $p < 0.001$) y (WKY-SSI: 0.36 ± 0.02 g/g VS WKY-MCT: 0.54 ± 0.01 g/g, $p < 0.01$). Entre los dos grupos con HAP también hay diferencia en esta relación, es mayor en el grupo WKY-MCT en comparación con el grupo SH-HAP-Espontanea (SH-HAP-Espontanea: 0.41 ± 0.01 g/g vs WKY-MCT: 0.54 ± 0.01 , $p < 0.01$) (Tabla 4)

13.3 En la HP se aumenta el diámetro de la AP y el espesor del VD

Los eventos pato fisiológicos que ocurren en la HAP generan aumento de la resistencia de los vasos pulmonares y aumento de la masa del VD, como lo podemos observar

en estos resultados en donde se encontró un aumento en el peso de VD en los grupos de HAP espontánea y por MCT en comparación con sus controles respectivos (WKY-Control: 0.232 ± 10 g vs SH-HAP-Espontánea: 0.456 ± 17 g, $p < 0.01$) y (WKY-SSI: 0.215 ± 9 g vs WKY-MCT: 0.298 ± 0.12 g, $p < 0.05$). También podemos observar que el VD de las ratas con HAP espontánea presentan un mayor peso de VD en comparación con el VD del grupo con HAP por MCT (WKY-MCT: 0.298 ± 0.12 g vs SH-HAP-Espontánea: 0.456 ± 17 g, $p < 0.001$) (tabla 4).

También el espesor de la pared libre de VD lo encontramos aumentado en los grupos de HAP espontánea y por administración de MCT (WKY-Control: 1.97 ± 0.08 mm vs SH-HAP-Espontánea: 2.9 ± 0.1 mm, $p < 0.05$) y (WKY SSI: 1.8 ± 0.9 mm vs WKY-MCT: 3.2 ± 0.11 , $p < 0.001$) (Tabla 4).

En este trabajo encontramos una correlación entre el peso del corazón y el peso del ventrículo derecho al analizar por el método de Fulton la relación que existe entre peso de VD con el peso de corazón, esta relación está aumentada en los grupos SH-HAP-Espontánea y WKY-MCT en relación a sus controles específicos (WK-Control: 22.8 ± 0.075 g/g vs SH-HAP-Espontánea: 31.4 ± 1.1 g/g, $*p < 0.01$) y (WKY-SSI: 23.8 ± 2.4 g/g vs WKY-MCT: 26.6 ± 1.3 g/g, $*p < 0.05$) (Tabla 4).

La hipertrofia VD que encontramos en los corazones de las ratas con HAP espontánea y por MCT es producto de alteraciones en las arterias pulmonares tanto de conductancia como de resistencia, las arterias pulmonares en ambos modelos se hipertrofian lo que ocasiona aumento de la resistencia vascular pulmonar y que desencadena que el VD se hipertrofie para compensar este aumento en la resistencia vascular pulmonar. Al analizar el diámetro de la arteria de conductancia (tronco pulmonar) encontramos que el diámetro está aumentado en el grupo SH-HAP-Espontánea y WKY-MCT en relación con sus controles respectivos (WKY-Control: 1.95 ± 0.038 mm vs SH-HAP-Espontánea: 2.7 ± 0.050 mm, $p < 0.001$) y (WKY-SSI: 1.9 ± 0.12 mm vs WKY-MCT: 3.9 ± 0.09 mm, $p < 0.01$) (tabla 4).

13.4 Reactividad vascular.

13.4.1 Evaluación de la viabilidad de los anillos de arteria pulmonar (AP)

Para los estudios de reactividad vascular del tronco de la arteria pulmonar, en primera instancia se evalúa la viabilidad celular, con el propósito de determinar si los anillos de la AP

con y sin endotelio se contraen y se relajan con los parámetros adecuados establecidos. Primero se contraen los anillos de AP con fenilefrina (1 μ M) para posteriormente inducir relajación con acetilcolina (1 μ M).

Los anillos de arteria pulmonar con y sin endotelio de las ratas SH-HAP-Espontánea y WKY-MCT presentan casi un 50 % menos de contracción que sus controles respectivos.

En la relajación también los anillos de arteria pulmonar con endotelio de las ratas SH-HAP-Espontánea y WKY-MCT se relajan aproximadamente menos que los anillos de los controles y los anillos sin endotelio se relajan menos del 20 % en todos los grupos (Figura 12).

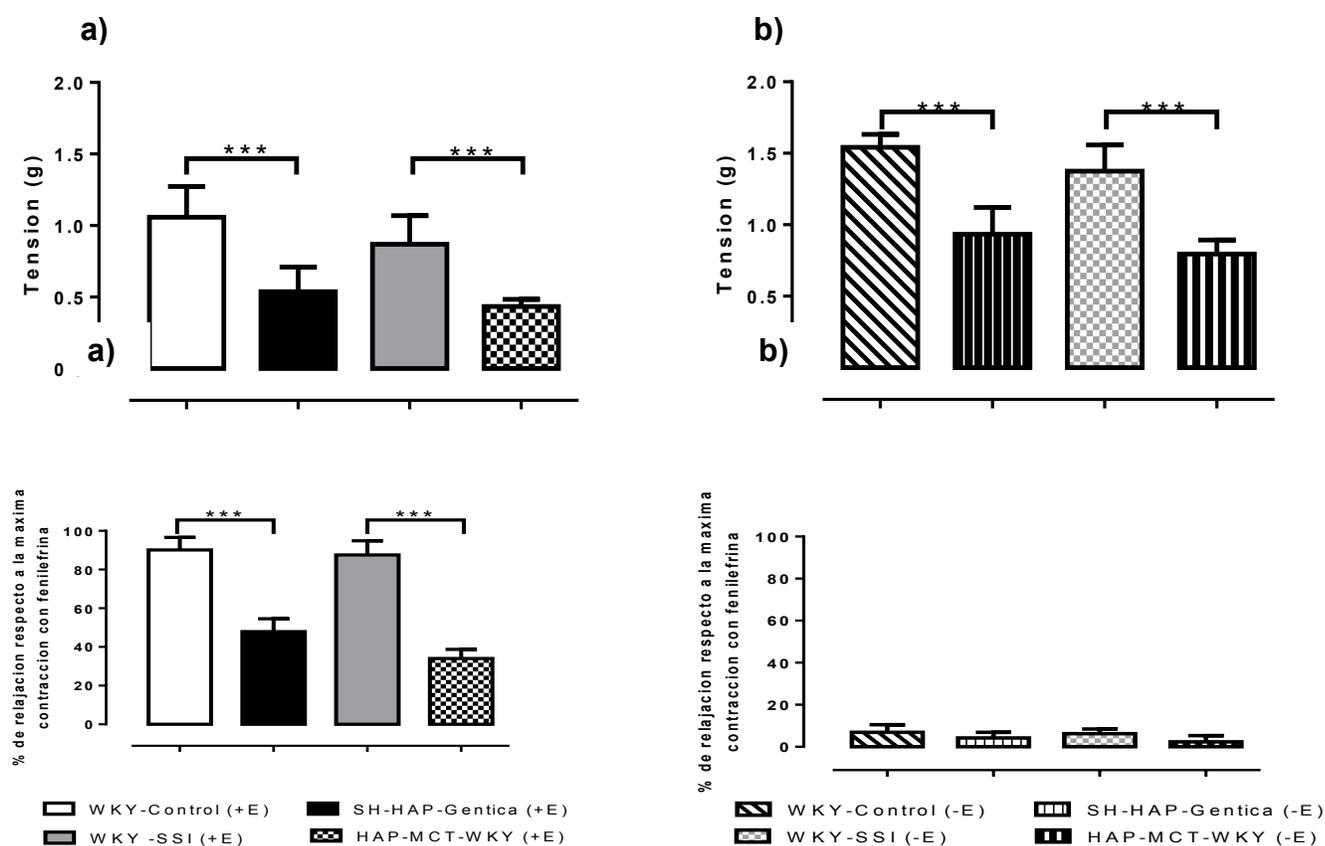


Figura 12. - En la figura se muestran los resultados de la viabilidad celular del tronco de la AP con y sin endotelio de los cuatro grupos experimentales. En a) se muestra la contracción inducida con fenilefrina (1 μ M) y en b) se muestra la contracción inducida con acetilcolina (1 μ M). Los resultados obtenidos fueron disminución en la contracción y relajación en la AP de ratas HAP espontánea y por MCT en relación a su control respectivo (n=20 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. ***p<0.001.

13.4.2 Efecto de la Fenilefrina en anillos de AP.

En los anillos de arteria pulmonar de los cuatro grupos el agonista de los receptores adrenérgicos alfa 1 fenilefrina induce contracción dependiente de la concentración, sin embargo, al evaluar el efecto máximo (Emax) encontramos que la contracción esta amortiguada en los anillos con endotelio y sin endotelio en los grupos de HAP espontánea y por MCT en relación a su control, grupo HAP espontánea (Emax (g): 152 ± 0.06 y 0.88 ± 0.05 en el control y en SH-HAP-Espontánea respectivamente, $p < 0.001$) y sin endotelio (Emax (g): 1.98 ± 0.08 y 0.98 ± 0.08 en el control y en SH-HAP-Espontánea respectivamente, $p < 0.001$) y en el grupo de HAP por MCT (Emax con endotelio (g): 1.53 ± 0.03 y 0.43 ± 0.03 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.001$) y sin endotelio (Emax (g): 1.98 ± 0.03 y 0.64 ± 0.03 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.001$) (Tabla 5. Y figura 13 a y b). También se requiere una mayor concentración de activación de estos receptores en el grupo de HAP por MCT en relación a su control en anillos con endotelio al evaluar la CE_{50} (CE_{50} (nM): 15 ± 0.06 y 62 ± 0.02 , en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.01$) y en el grupo de SH-HAP-Espontánea no existe diferencia entre las CE_{50} (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de Emax y CE_{50} en la AP de los cuatro grupos experimentales a Fenilefrina y Acetilcolina.

Grupo	Fenilefrina				Acetilcolina			
	+E		-E		+E		-E	
	Emax (g)	Ce50 (nM)	Emax (g)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	1.52 ± 0.06	18 ± 0.06	1.98 ± 0.08	14 ± 0.09	81 ± 1.7	57 ± 2.6	5.25 ± 1.71	365 ± 0.93
SH-HAP-Espontánea	$0.88 \pm 0.05^{***}$	$16 \pm 0.08^*$	$0.98 \pm 0.08^{***}$	13 ± 0.10	$52 \pm 3.9^{***}$	$268 \pm 3.02^{***}$	---	----
Control-SSI	1.53 ± 0.03	15 ± 0.06	1.98 ± 0.03	18 ± 0.09	93 ± 1.5	11 ± 2.1	9 ± 1.71	68 ± 0.93
WKY-MCT	$0.43 \pm 0.03^{***}$	$62 \pm 0.02^{**}$	$0.64 \pm 0.03^{***}$	$41 \pm 0.04^{***}$	$33 \pm 1.5^{***}$	$16 \pm 2.4^{**}$	$4 \pm 0.8^*$	$46 \pm 0.5^{**}$

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE_{50} ; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontánea: Hipertensión espontánea con hipertensión arterial pulmonar espontánea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** y $p < 0.001$ en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

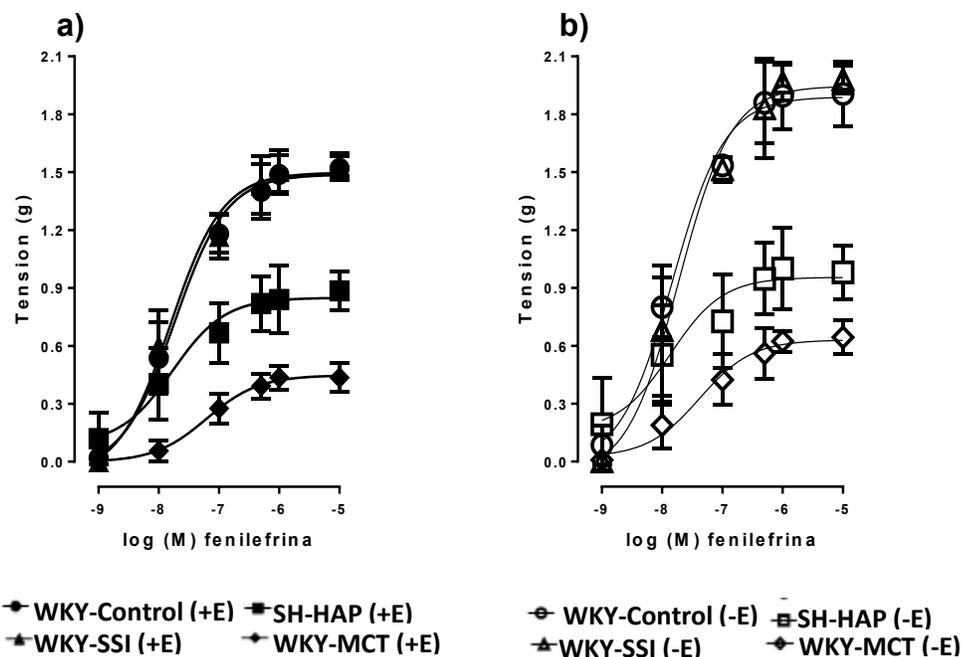


Figura 13.- En la figura se observa que la respuesta contráctil a fenilefrina en los anillos de AP con endotelio en a) y sin endotelio en (b) de ratas con HP-Espontanea y por MCT esta disminuida, (n=8 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para comparar las Emax y CE₅₀.

13.4.3 Efecto de la Acetilcolina en anillos de AP.

La acetilcolina induce relajación dependiente de endotelio en los anillos de AP, los resultados que obtuvimos muestran una disminución en la relajación máxima (expresada en porcentaje) en los anillos de AP con endotelio de ratas con HAP-espontánea en comparación con su control, SH-HAP-Espontanea (Emax (%): 81 ± 1.7 y 52 ± 3.9 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p < 0.001$) y en los anillos sin endotelio del grupo de HAP-Espontanea la acetilcolina produce contracción a concentraciones mayores a 500 nM (Tabla 5 y figura 14 a y b.).

En el grupo de HAP por MCT (Emax con endotelio (%): 93 ± 1.5 y 33 ± 1.5 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.001$) y sin endotelio (Emax (%): 9 ± 1.7 y 4 ± 0.8 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.05$) (Tabla 5. Y figura 14 a y b).

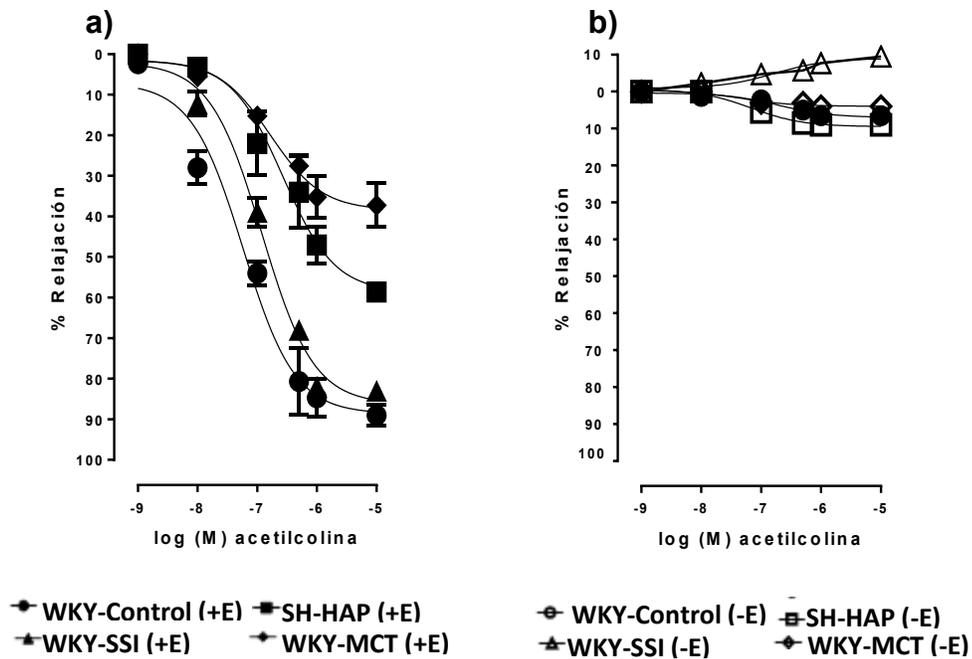


Figura 14.- En la figura se observa que la relajación inducida con acetilcolina en los anillos de AP con endotelio en a) y sin endotelio en b) de ratas con HAP-Espontanea y por MCT esta disminuida, (n=8 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para comparar las Emax y CE₅₀.

13.4.4 Efecto de la Apomorfina en anillos de AP.

Para poder evaluar la función fisiológica de los receptores dopaminérgicos de la familia D2, es necesario iniciar con un agonista general de estos receptores, la apomorfina. Nuestros resultados muestran que en los anillos con endotelio de AP de los dos grupos produce relajación dependiente de la concentración, pero algo importante de resaltar, es que también en los anillos sin endotelio de los dos grupos ejerce importante relajación. Al analizar las curvas encontramos que la relajación máxima no es diferente entre los anillos de AP con y sin endotelio del grupo SH-HAP-Espontánea en comparación con su control y tampoco hay diferencia en la CE₅₀ entre estos grupos (Tabla 3 y figura 2a y 2b).

En el grupo de HAP por MCT (la Emax con endotelio (g): 91 ± 2.4 y 71 ± 1.4 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.001$) y sin endotelio (Emax (g): 76 ± 2.0 y 57 ± 2.3 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.05$) (Tabla 6. Y figura 15 a y b).

Tabla 6. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP de los cuatro grupos experimentales a Apomorfina.

Grupo	Apomorfina			
	+E		-E	
	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	91±3.1	130±2.3	62±8.4	193±5.2
SH-HAP-Espontanea	91±2.6	376±2.4** *	65±4.9	681±3.2***
Control-SSI	91±2.4	146±2.7	76±2.0	209±2.2
WKY-MCT	71±1.4***	152±2.3	57±2.3*	344±2.2**

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

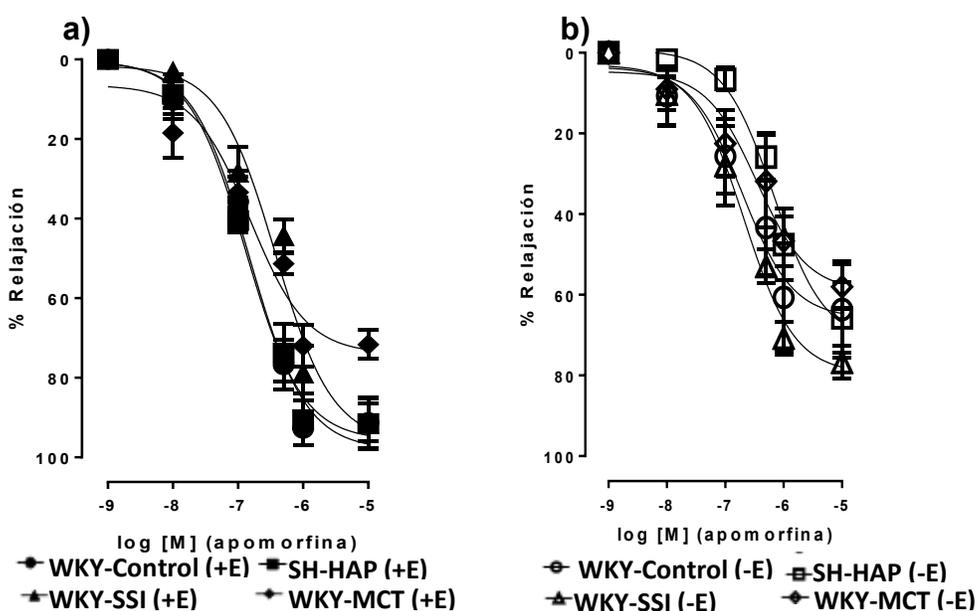


Figura 15.- En la figura se observa que la relajación inducida con apomorfina en los anillos de AP con endotelio en a) y sin endotelio en (b) de ratas con HP-Espontanea y por MCT esta disminuida, (n=8 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para comparar las Emax y CE₅₀.

Este efecto se bloqueó con el antagonista del receptor D₄ el L-750 en los anillos de AP del grupo control (Emax (%) con endotelio: 91±3.1 y 43±4.1 en ausencia y en presencia de

antagonista respectivamente, $p < 0.001$) (Tabla 4 y figura 4) y también se modifica la CE_{50} (CE_{50} (nM) con endotelio: 130 ± 2.3 y 303 ± 4.2 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, $p < 0.05$), este mismo comportamiento se presenta en los anillos sin endotelio (Tabla 7 y figura 16).

Tabla 7. Valores de E_{max} y CE_{50} en la AP con el agonista Apomorfina y presencia del antagonista L-750.

Grupo	Apomorfina (Antagonista D ₄ : L-750)	
	E_{max} (g)	CE_{50} (nM)
Control-WKY (CE) sin antagonista	91 ± 3.1	130 ± 2.3
Control-WKY (CE) con antagonista	43 ± 4.1	303 ± 4.2
Control-WKY (SE) sin antagonista	62 ± 8.4	193 ± 5.2
Control-WKY (SE) con antagonista	33 ± 3.1	93 ± 2.2

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; E_{max} : Efecto máximo; CE_{50} : Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** y $p < 0.001$ en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

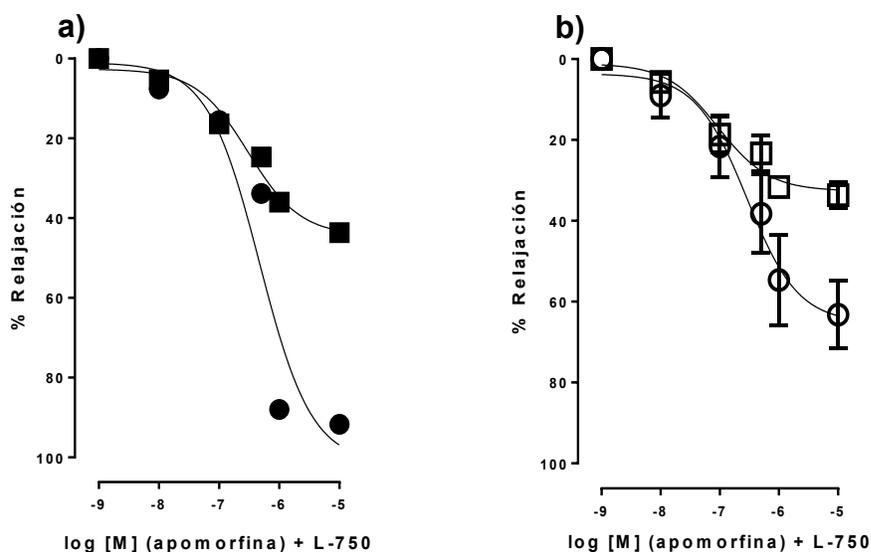


Figura 16.- El antagonista del receptor D₄ el L-750 bloquea el efecto vasodilatador de la apomorfina en a) con endotelio y b) sin endotelio. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las E_{max} y CE_{50} .

13.4.5 Efecto del SKF 38393 en anillos de AP.

El agonista del receptor D1 (SKF38393) produce vasorelajación en anillos con endotelio y el efecto es menor en los anillos pulmonares de las ratas con HAP espontánea con respecto al control (Emax (%): 71 ± 2.2 y 46 ± 3.9 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p < 0.001$) (Tabla 3 y figura 2c) y sin endotelio (Emax (g): 29 ± 1.2 y 14 ± 1.8 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p < 0.05$). En el grupo de HAP por MCT (la Emax con endotelio (g): 71 ± 1.9 y 34 ± 4.3 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.001$) y sin endotelio (Emax (g): 31 ± 2.0 y 15 ± 5.0 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.01$) (Tabla 8. Y figura 17 a y b).

Tabla 8. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista SKF 38393

Grupo	SKF 38393			
	+E		-E	
	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	71 ± 2.2	113 ± 3.5	29 ± 1.2	115 ± 1.2
SH-HAP-Espontanea	$46 \pm 3.9^{***}$	111 ± 2.5	$14 \pm 1.8^*$	123 ± 2.0
Control-SSI	71 ± 1.9	205 ± 2.4	31 ± 2.0	445 ± 1.4
WKY-MCT	$34 \pm 4.3^{***}$	$173 \pm 2.3^{**}$	$15 \pm 5.0^{**}$	$299 \pm 4.5^{***}$

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀: Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** y $p < 0.001$ en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

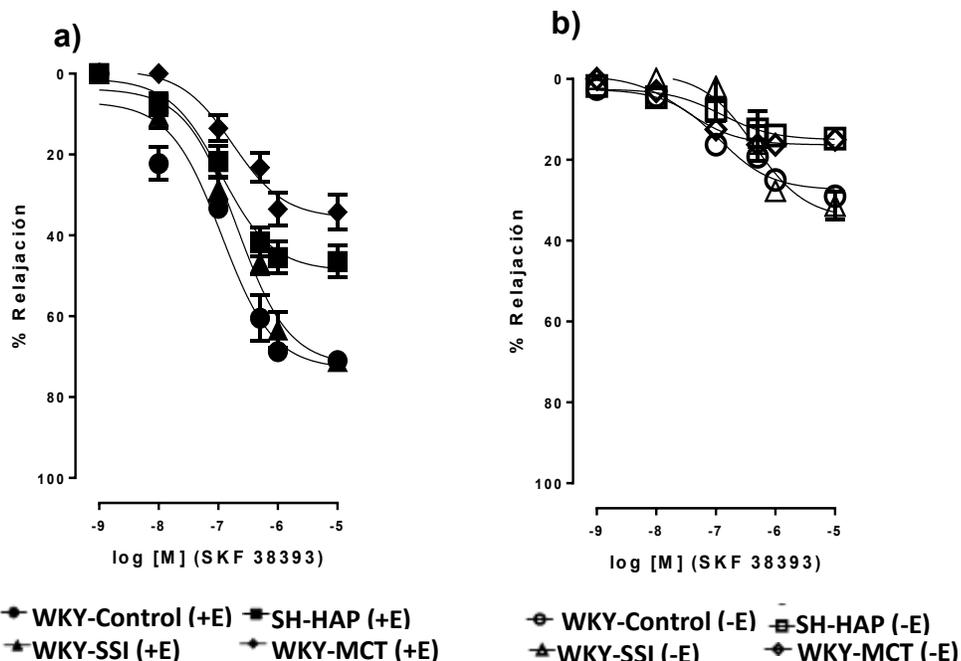


Figura 17.- La activación del receptor D_1 con SKF38393 produce vasodilatación en los anillos con endotelio (a) pero no en los anillos sin endotelio (b) y esta vasodilatación es menor en los anillos de AP de ratas con HP-Espontanea y por MCT en comparación con el control respectivo. (n=8 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para evaluar la Emax y CE_{50}

Este efecto se bloqueó con el antagonista del receptor D_1 el SCH-23390 en los anillos de AP del grupo control (Emax (%) con endotelio: 71.3 ± 2.2 y 10 ± 2.4 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, $p < 0.001$) (Tabla 4 y figura 4) y también se modifica la CE_{50} (CE_{50} (nM) con endotelio: 113 ± 3.5 y 8220 ± 2.6 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, $p < 0.001$), este mismo comportamiento se presenta en los anillos sin endotelio (Tabla 9 y figura 18).

Tabla 9. Valores de Emax y CE_{50} en la AP con el agonista SKF 38393 y presencia del antagonista SCH-23390.

Grupo	SKF (Antagonista D_1 :SCH-23390)	
	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY (CE) sin antagonista	71 ± 2.2	113 ± 3.5
Control-WKY (CE) con antagonista	10 ± 2.4	8220 ± 2.6
Control-WKY (SE) sin antagonista	29 ± 1.2	115 ± 1.2
Control-WKY (SE) con antagonista	3 ± 1	2261 ± 0.3

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE_{50} ; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** y $p < 0.001$ en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

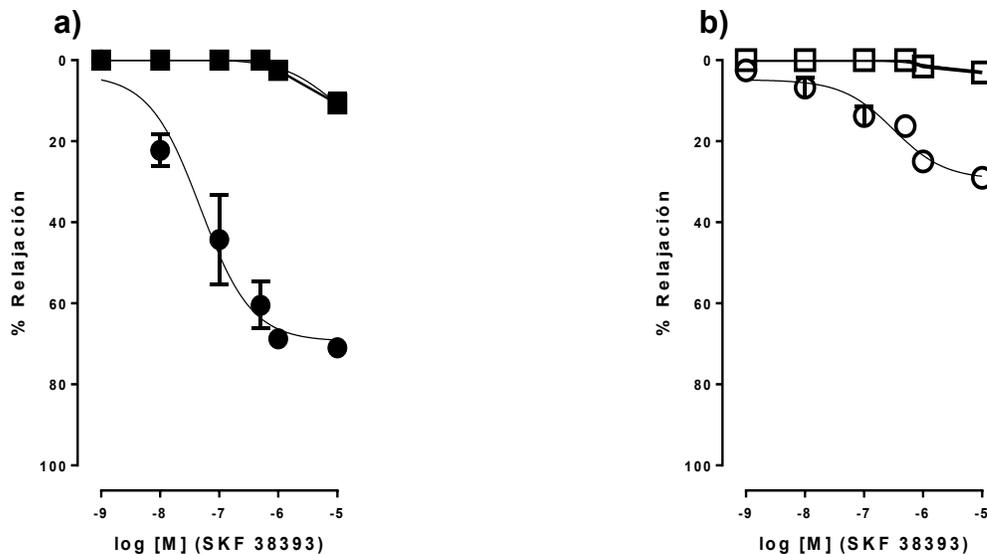


Figura 18- El antagonista del receptor D₁ el SCH-23390 bloquea el efecto vasodilatador del SKF 38393 en a) con endotelio y b) sin endotelio. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las E_{max} y CE₅₀.

13.4.6 Efecto del agonista del receptor dopaminérgico D₂, el quinpirole en la arteria pulmonar de ratas con HAP.

También las arterias pulmonares con endotelio respondieron al agonista D₂ quinpirole con una relajación concentración dependiente y el efecto es menor en los anillos pulmonares con endotelio de las ratas con HAP-Espontanea con respecto al control (E_{max} (%): 64 \pm 5.1 y 37 \pm 2.7 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p < 0.01$) (Tabla 10 y figura 19), además, también produce mínima vasorelajación en los anillos pulmonares sin endotelio en el grupo control, aunque a dosis más altas y la CE₅₀ es mayor en el grupo de HAP en los anillos con endotelio entre los grupos (CE₅₀ (nM): 208 \pm 4.9 y 785 \pm 1.2 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p < 0.01$) (Tabla 10 y figura 19).

En el grupo de HAP por MCT también esta disminuida la relajación a este agonista en los anillos con endotelio (E_{max} (g): 54 \pm 6.1 y 33 \pm 3.3 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.01$) y en los anillos sin endotelio la relajación es mínima en ambos grupos. Las CE₅₀ son diferentes en ambos grupos (CE₅₀ con endotelio (nM): 166 \pm 3.8 y 236 \pm 1.7 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.01$) y sin endotelio (CE₅₀: 3403 \pm 0.5 y 38 \pm 0.5 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p < 0.01$).

Tabla 10. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista Quinpirole.

Grupo	Qinpirole			
	+E		-E	
	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	64 ± 5.1	208 ± 3.1	19 ± 6.7	895 ± 3.5
SH-HAP-Espontanea	37 ± 2.7 **	785 ± 1.2 ***	5 ± 2.9*	511 ± 1.2 ***
Control-SSI	54±6.1	166±3.8	9±2.2	3403±0.5
WKY-MCT	33±3.3*	236±1.7***	1±0.7*	38±0.5***

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

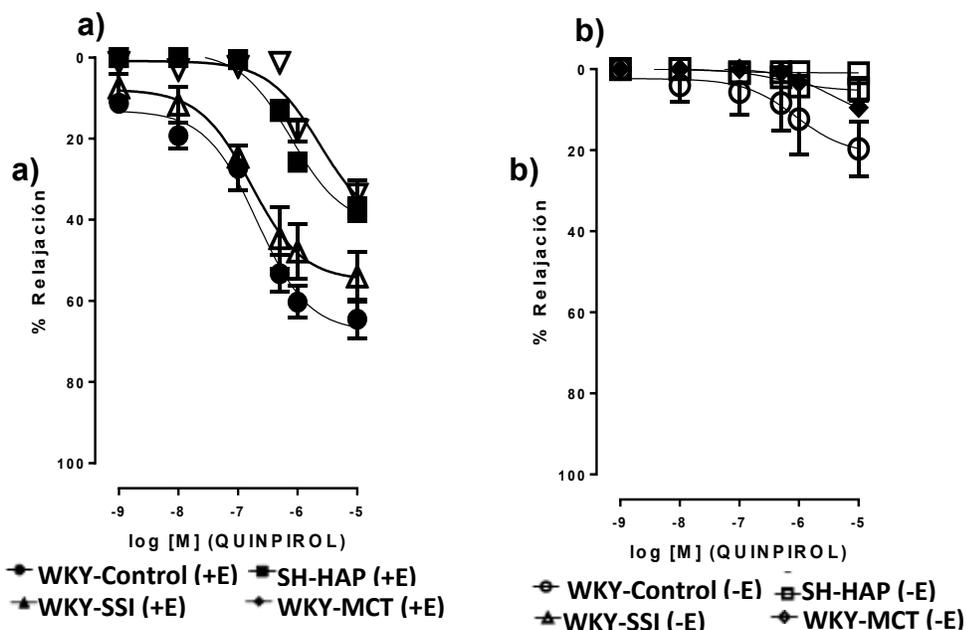


Figura 19.- La estimulación del receptor D₂ con quinpirole produce una mayor vasodilatación en los anillos con endotelio (a) que en los anillos sin endotelio (b) y esta vasodilatación es menor en los anillos de AP de ratas con HP-Espontanea en comparación con el control. (n=4 para ambos grupos). Los resultados se expresan como la media ± error estándar. T-student para evaluar las Emax y las pD₂. *p<0.05.

Este efecto se bloqueó con el antagonista del receptor D₂ el Raclopride en los anillos de AP del grupo control (Emax (%) con endotelio: 64.3±5.1 y 14±0.95 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, p<0.001) (Tabla 11 y figura 20) y también se modifica la

CE₅₀ (CE₅₀ (nM) con endotelio: 208±3.1 y 1331±0.84 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, p<0.001), este mismo comportamiento se presenta en los anillos sin endotelio (Tabla 11 y figura 20).

Tabla 11. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista Quinpirole y presencia del antagonista Raclopride.

Grupo	Quinpirole (Antagonista D ₂ : Raclopride)	
	Emax (g)	Ce50 (nM)
Control-WKY (CE) sin antagonista	64 ± 5.1	208 ± 3.1
Control-WKY (CE) con antagonista	14 ± 0.95	1331 ± 0.84
Control-WKY (SE) sin antagonista	19 ± 6.7	895 ± 3.5
Control-WKY (SE) con antagonista	5 ± 1.2	820 ± 0.68

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

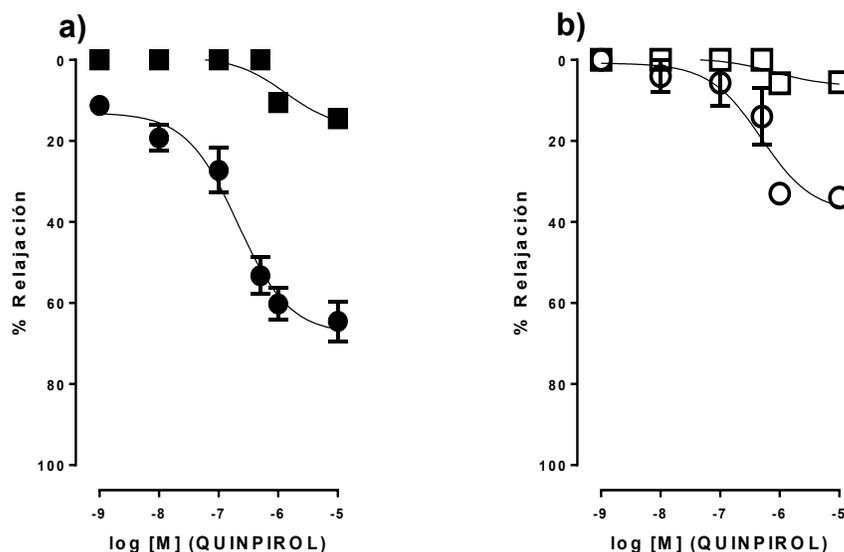


Figura 20.- El antagonista del receptor D₂ el Raclopride bloquea el efecto vasodilatador del Quinpirole en a) con endotelio y b) sin endotelio. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las Emax y CE₅₀.

13.4.7 El 7-OH-DPAT produce vasoconstricción de anillos de AP

Al evaluar el efecto de la estimulación del receptor D₃ en anillos de arteria pulmonar con el 7-OHDPAT encontramos que se produce vasoconstricción concentración dependiente. Lo

que podemos observar cuando evaluamos el Emax es que la vasoconstricción en los anillos con y sin endotelio de AP de las ratas con HAP espontánea y por MCT esta disminuida en comparación con el control (Emax (g) con endotelio: 0.6 ± 0.02 y 0.45 ± 0.02 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$) y sin endotelio (Emax (g): 0.98 ± 0.04 y 0.51 ± 0.03 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$). También las CE_{50} son diferentes entre los grupos, necesitando más concentración de fármaco para alcanzar el 50 % de efecto en el grupo con SH-HAP-Espontanea (CE_{50} (nM) con endotelio: 405 ± 0.01 y 652 ± 0.01 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$) y sin endotelio (CE_{50} (nM): 343 ± 0.06 y 57 ± 0.03 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$) (Tabla 5 y figura 3a y 3 b). En el grupo de HAP por MCT (Emax (g) con endotelio: 0.58 ± 0.03 y 0.3 ± 0.02 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p<0.01$) y sin endotelio (Emax (g): 0.97 ± 0.08 y 0.40 ± 0.02 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, $p<0.01$). También las CE_{50} son diferentes entre los grupos, necesitando más concentración de fármaco para alcanzar el 50 % de efecto en el grupo HAP-MCT (CE_{50} (nM) con endotelio: 405 ± 0.01 y 652 ± 0.01 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$) y sin endotelio (CE_{50} (nM): 343 ± 0.06 y 572 ± 0.03 en el control y en SH-HAP-Espontanea respectivamente, $p<0.01$) (Tabla 13 y figura 21 a y b).

Tabla 13. Valores de Emax y CE_{50} en la AP con el agonista 7-OH-DPAT.

Grupo	7-OH-DPAT			
	+E		-E	
	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	0.60 ± 0.02	405 ± 0.01	0.98 ± 0.04	343 ± 0.06
SH-HAP-Espontanea	$0.45\pm 0.02^{***}$	$652\pm 0.01^{***}$	$0.51\pm 0.03^{***}$	$572\pm 0.03^{***}$
Control-SSI	0.58 ± 0.03	352 ± 0.02	0.97 ± 0.08	646 ± 0.05
WKY-MCT	$0.3\pm 0.02^{***}$	$360\pm 0.01^*$	$0.40\pm 0.02^{***}$	$210\pm 0.01^{***}$

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE_{50} ; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** y $p<0.001$ en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

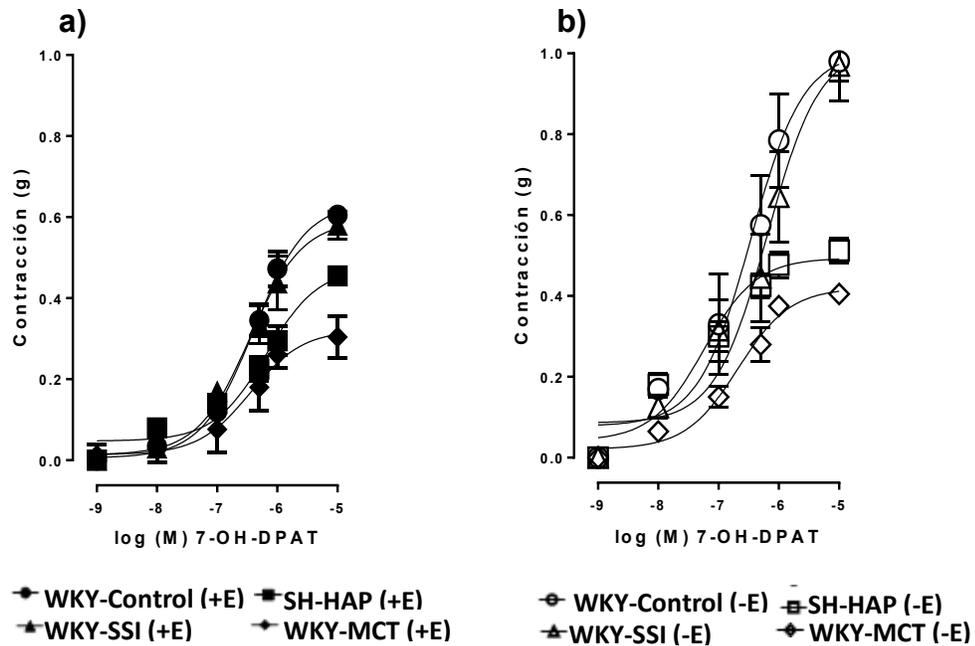


Figura 21.- La activación del receptor D_3 con 7-OH-DPAT produce vasoconstricción en los anillos con (a) y sin endotelio (b) y esta vasoconstricción es menor en los anillos de AP de ratas con HAP-Espontanea y por MCT en comparación con el control respectivo. ($n=8$ para cada grupo). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para evaluar la E_{max} y CE_{50} .

Este efecto se bloqueó con el antagonista del receptor D_3 el U99199 en los anillos de AP del grupo control (E_{max} (g) con endotelio: 0.60 ± 0.02 y 0.40 ± 0.03 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, $p < 0.05$) (Tabla 5 y figura 3) y también se modifica la CE_{50} (CE_{50} (nM) con endotelio: 405 ± 0.01 y 372 ± 0.01 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, $p < 0.001$), este mismo comportamiento se presenta en los anillos sin endotelio (Tabla 14 y figura 22).

Tabla 14. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista 7-OH-DPAT y presencia del antagonista U99199.

7-OHDPAT (Antagonista D₃: U99199)		
Grupo	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY (CE) sin antagonista	0.60±0.02	405±0.01
Control-WKY (CE) con antagonista	0.40±0.03	372±0.01
Control-WKY (SE) sin antagonista	0.98±0.04	343±0.06
Control-WKY (SE) con antagonista	0.68±0.04	229±0.03

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

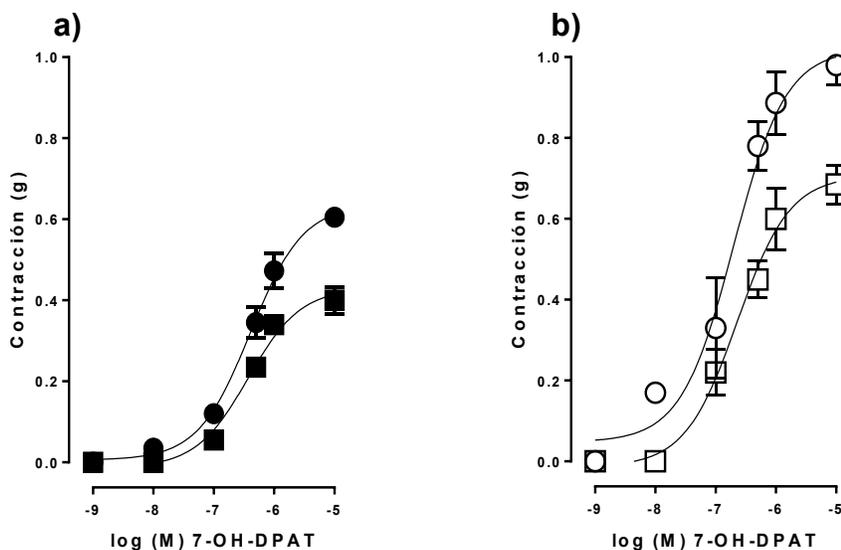


Figura 22.- El antagonista del receptor D₃ el U99199 bloquea el efecto vasoconstrictor del 7-OH-DPAT en c) con endotelio y d) sin endotelio. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las Emax y CE₅₀.

13.4.8 El PD produce vasoconstricción de anillos de AP

El agonista D4 (PD 168077) produce vasorelajación, es similar al efecto de la apomorfina, esta relajación se produce tanto en los anillos con endotelio como en los anillos sin endotelio, la relajación es muy similar entre el grupo de HAP-Espontanea y HAP-por MCT respecto a su control respectivo. (Tabla 15 y figura 23).

Tabla 15. Valores de Emax y CE₅₀ en la AP con el agonista PD 168077.

Grupo	PD 168077			
	+E		-E	
	Emax (%)	Ce50 (nM)	Emax (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY	94 ± 3.6	253 ± 4.1	75 ± 7.0	567 ± 4.8
SH-HAP-Espontanea	91 ± 2.6	341 ± 2.6	83 ± 3.5*	581 ± 2.9*
Control-SSI	86 ± 2.6	195 ± 1.9	70 ± 2.7	1035 ± 1.5
WKY-MCT	88 ± 2.9	443 ± 2.2	63 ± 5.5*	936 ± 2.6***

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; Emax: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

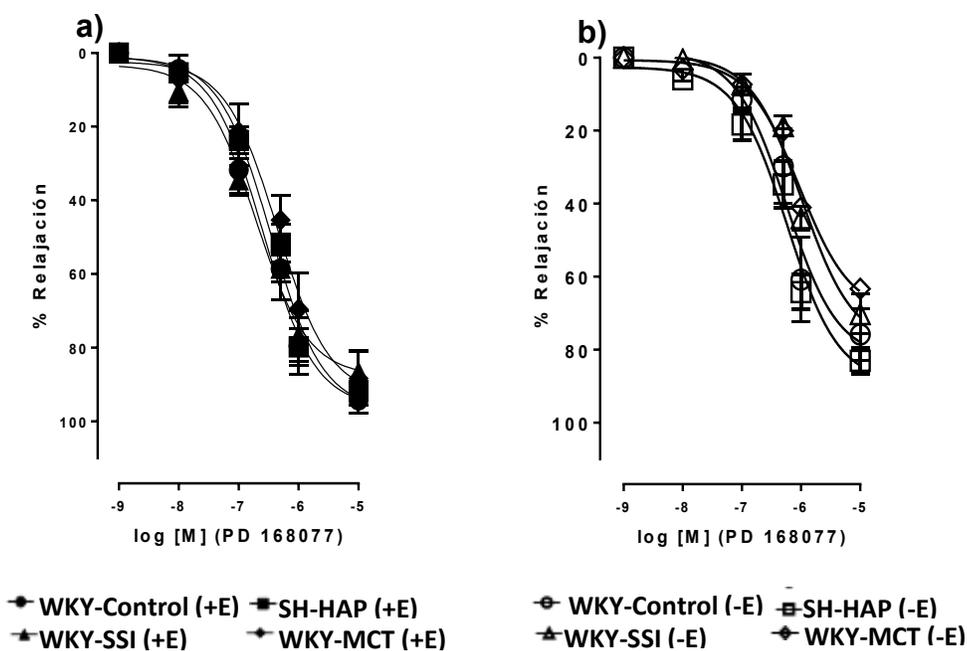


Figura 23.- El PD 168077 produce vasodilatación en los anillos de AP con endotelio (a) y sin endotelio (b), y el Emax no es significativamente diferente entre los cuatro grupos. (n=8 para cada grupo). Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las Emax y la CE₅₀.

Este efecto se bloqueó con el antagonista del receptor D₄ el L-750 en los anillos de AP del grupo control (E_{max} (%) con endotelio: 94±3.6y 29±4.9 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, p<0.001) (Tabla 4 y figura 4) y también se modifica la CE₅₀ (CE₅₀ (nM) con endotelio: 253±2.11y 1011±2.5 en ausencia y en presencia de antagonista respectivamente, p<0.001), este mismo comportamiento se presenta en los anillos sin endotelio (Tabla 16 y figura 24).

Tabla 16. Valores de E_{max} y CE₅₀ en la AP con el agonista PD 168077 y presencia del antagonista L-750.

PD168077 (Antagonista D₄: L-750)		
Grupo	E_{max} (%)	Ce50 (nM)
Control-WKY (CE) sin antagonista	94 ± 3.6	253 ± 4.1
Control-WKY (CE) con antagonista	29 ± 4.9***	1011 ± 2.5***
Control-WKY (SE) sin antagonista	75 ± 7.0	567 ± 4.8
Control-WKY (SE) con antagonista	26 ± 3.4**	905 ± 1.2**

+E: Con endotelio; -E: Sin endotelio; E_{max}: Efecto máximo; CE₅₀; Control-WKY: Wistar Kyoto control; SH-HAP-Espontanea: Hipertensa espontanea con hipertensión arterial pulmonar espontanea; SSI: Solución Salina Isotónica y WKY-HAP-MCT: Wistar Kyoto con hipertensión arterial pulmonar por monocrotalina. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. *p<0.05; **p<0.01 *** y p<0.001 en relación con su control respectivo. N=8 para cada grupo.

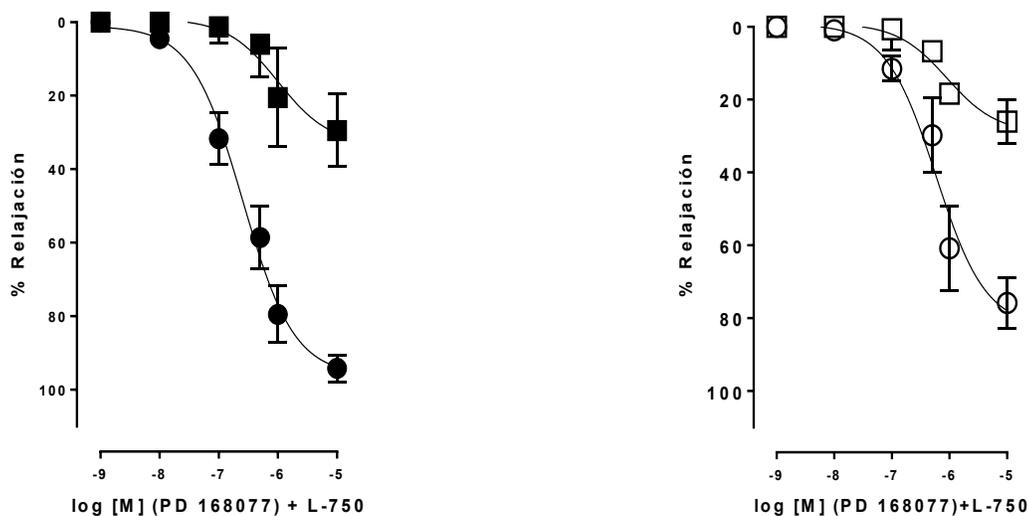


Figura 24.- El antagonista del receptor D₄ el L-750 bloquea el efecto vasodilatador del PD 168077 en a) con endotelio y b) sin endotelio. Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey para analizar las E_{max} y CE₅₀.

14 La HAP reduce los niveles de óxido nítrico en la AP

En la HAP espontánea y por MCT los niveles de NO₂ están disminuidos en relación a su control respectivo. En el grupo de HAP espontánea (NO₂ (μM): 4.1±0.38 y 2.4±0.28 en el control y en SH-HAP-Espontánea respectivamente, p<0.01) y en el grupo de HAP por MCT (NO₂ (μM) 5 ±0.28 y 1±0.12 en el control y en WKY-HAP-MCT respectivamente, p<0.001).

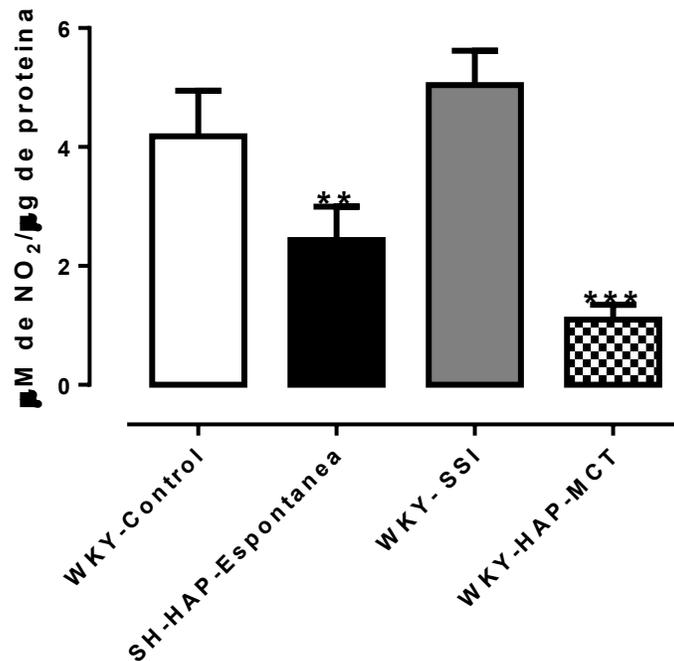


Figura 25.-En esta figura se representan en los niveles del metabolito del ON, los NO₂ en homogenados de AP. En estos resultados preliminares se observa que existe una disminución en la concentración de ON en la AP De ratas con HP-Espontánea y por MCT (n=4) respecto a su control respectivo (n=4). Los resultados se expresan como la media ± error estándar. ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. ***p<0.001.

15 La HAP produce hipertrofia de la pared de la AP

En la HAP espontánea existe aumento del espesor de la pared de la AP a expensas de la capa adventicia, mientras que en la HAP por MCT existe también aumento de la pared de la AP a expensas de la capa de células de musculo liso.

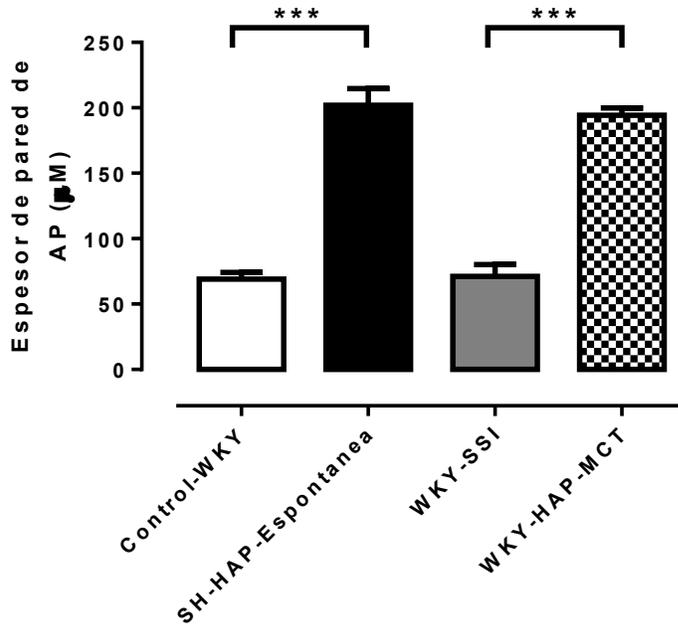
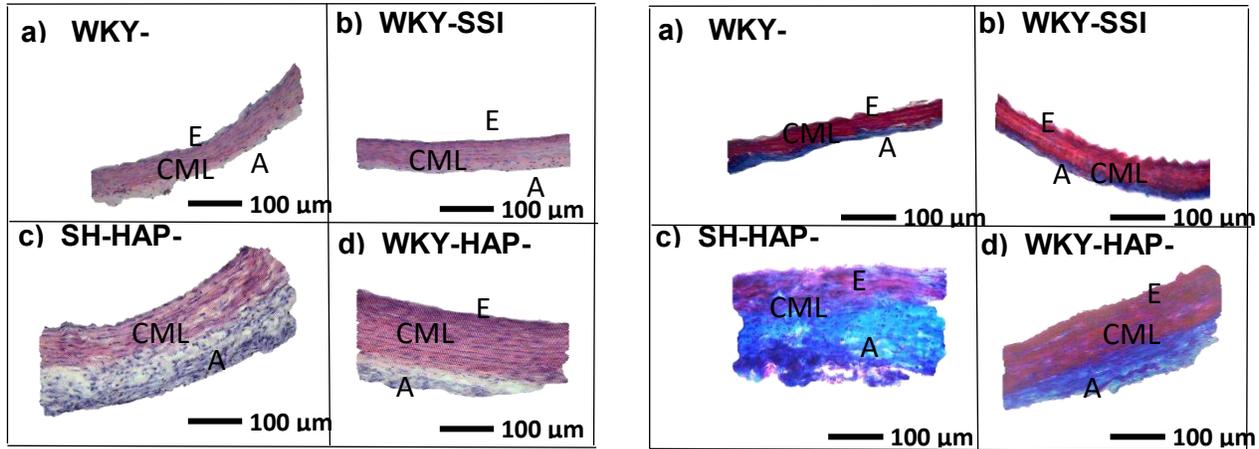


Figura 26.- En la figura se muestra la hipertrofia de la arteria pulmonar a expensas de la hiperplasia de la capa media y adventicia (n=8 por grupo). ANOVA de una vía con un pos hoc Tukey. ***p<0.001. Amplificación a 10 X.

16 Discusión de resultados.

En el presente estudio, la HAP inducida por MCT causó una disminución significativa en la ganancia de peso corporal final, este bajo peso puede deberse a que el MCT está asociado con la disminución del crecimiento en las ratas producto de inducción de anorexia severa y el aumento en la expresión de atrogenes y del factor de necrosis tumoral α (TNF α) que promueven la atrofia muscular y por lo tanto se imita a la caquexia y la pérdida de masa muscular esquelética informada en pacientes con HAP (Steffen y cols., 2008; Laurencó y cols., 2011), caso contrario a la HAP en las ratas SH, estas ratas aunque no presentan caquexia, si tienen un peso menor a su control como esta reportado por Sen y cols., 1974 que estas ratas tienen un desarrollo menor al control normotenso debido a la hipertensión sistémica que presentan.

La disminución en el peso corporal fue acompañada con un aumento significativo en el peso del corazón, en la relación peso de corazón/peso corporal, peso de ventrículo derecho y espesor de ventrículo derecho en ambos grupos con HAP en relación a sus controles respectivos. Analizando el peso del corazón podemos observar que es mayor el peso de corazón en las ratas con HAP en relación a las ratas con HAP por monocrotalina, este resultado puede deberse a que las ratas hipertensas espontaneas desarrollan hipertrofia de ventrículo izquierdo y sumado a la hipertrofia de ventrículo derecho (Damatto y cols., 2016) el corazón es más pesado (Álvarez y cols., 2008) en comparación a las ratas administradas con monocrotalina que al ser normotensas solo desarrollan hipertrofia de VD, otro factor que podría ser responsable del mayor peso del corazón en el grupo con HAP de la cepa SH en relación al grupo de HAP por monocrotalina es el peso corporal, ya que esta reportado que el tamaño de algunos órganos, entre ellos el corazón es directamente proporcional al peso corporal (Noragi y cols., 2014), tomando en cuenta este parámetro analizamos la relación peso corazón/peso corporal y lo que encontramos es que esta relación esta aumentada en ambos grupo de HAP pero es más alto este valor en el grupo de HAP por monocrotalina en comparación con el grupo de HAP de la cepa SH, resultado contrario al del peso del corazón. Este resultado sumado al aumento del peso del corazón es un indicativo de la existencia de hipertrofia cardiaca, esta hipertrofia cardiaca depende en estos dos grupos de HAP de la hipertrofia de VD, el peso de VD en estos dos grupos esta aumentado en relación a sus

controles respectivos, en este caso el VD de las ratas con HAP espontánea es mayor en relación al grupo de monocrotalina, este resultado está relacionado con el mayor peso de corazón que presentan esas ratas. La relación peso VD/Peso de corazón es mayor en el grupo de monocrotalina en relación al de HAP espontánea indicando que la hipertrofia de VD es más severa en el grupo de monocrotalina. Estos resultados indican que existe hipertrofia cardíaca en diferentes grados que se refleja en mayor peso de corazón, dependiendo este, de la hipertrofia de VD como esta reportado para el modelo de HAP espontánea (Atkins y cols., 1995) y por monocrotalina (Hessel y cols., 2006).

Si bien se sabe que la hipertrofia del ventrículo derecho es consecuencia del aumento de la resistencia vascular pulmonar la cual se ha respaldado por la observación de que el trasplante de pulmón en pacientes con hipertensión arterial pulmonar tromboembólica crónica revierte la hipertrofia del ventrículo derecho (Pasque y cols., 1995). También existe información que muestra que la progresión de la disfunción del ventrículo derecho no siempre depende de los pulmones. Por ejemplo, los subgrupos de pacientes en tratamiento con vasodilatadores continúan desarrollando un empeoramiento de la función del ventrículo derecho a pesar de la mejora de la hemodinámica de la arteria pulmonar (Girgis y cols., 2011). Existe consenso en que el aumento de la poscarga causada por la remodelación vascular pulmonar inicia la hipertrofia del ventrículo derecho, pero los determinantes que conducen a la remodelación adaptativa versus la falla del ventrículo derecho (hipertrofia desadaptativa) son muy heterogéneos y que esta condición es la que determina la sobrevivencia de los pacientes o de los modelos animales. En nuestro estudio podría estar pasando esto ya que la sobrevivencia de las ratas que desarrollan HAP cuando se les administra MCT es muy baja en relación con el modelo de HAP espontánea, lo que nos podría sugerir que en las ratas con HAP espontánea la hipertrofia del VD es adaptativa versus la hipertrofia de VD en el modelo de MCT que es no adaptativa y por lo cual existe falla de este ventrículo.

La hipertrofia de VD no adaptativa se puede asociar directamente con un proceso de isquemia producto de una alteración en el suministro de sangre al ventrículo derecho en la HAP. En modelos de HAP por monocrotalina se ha demostrado que tienen rarefacción capilar (Bogaard y cols., 2009). En estudios histológicos se muestra una densidad reducida de microvasos en el ventrículo derecho de pacientes con HAP (Piao y cols., 2013). Este

proceso disminuido de la angiogénesis se manifiesta con la disminución de la expresión de genes angiogénicos (VEGF, IGF-1 y angiopoetina-1). También se presenta desregulación del sistema nervioso autónomo que se manifiesta con regulación a la baja y desensibilización de los receptores α y β -adrenérgicos en los miocitos del VD (Oikawa y cols., 2005).

Los cardiomiocitos que se agrandan rápidamente cambian de generación de energía aeróbica a anaeróbica, lo que resulta en el crecimiento celular en condiciones relativamente hipóxicas.

La hipertrofia de VD es producto del aumento de la resistencia vascular pulmonar ocasionada por el remodelamiento de los vasos pulmonares de resistencia y de conductancia, en este trabajo encontramos que existe un aumento en el diámetro externo del tronco de la arteria pulmonar en los grupos de HAP, la asociación entre la dilatación de AP y la HAP se ha documentado en estos pacientes (Shin y cols., 2014) debido a que el aumento de la presión intrapulmonar produce aumento de la tensión de cizallamiento lo que induce a la remodelación vascular, que incluye el engrosamiento vascular y la dilatación para compensar este aumento (Botney 1999).

Lo que pudimos observar es que las ratas administradas con monocrotalina presentan cambios estructurales más marcados que en las ratas con HAP espontánea y esto se refleja en los valores de presión de VD en donde las ratas del grupo de monocrotalina presentan mayor aumento de presión de VD que en las ratas con HAP espontánea, estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Shin y cols., en el 2014 en donde observo que a medida que aumenta el diámetro de la arteria pulmonar, la presión de VD también aumentaba.

Esta diferencia en gravedad de los parámetros evaluados entre los dos modelos de HAP se debe a la diferencia fisiopatológica por el cual generan el remodelamiento vascular pulmonar que impacta en el VD y que desencadena en la HAP en estas ratas.

En la rata hipertensa espontánea se propone que se genera HAP por un aumento en los niveles de leptina y expresión del receptor a leptina (Gomart y cols., 2014), similar a lo reportado en humanos donde en la HAP de tipo idiopática se propone la existencia de niveles elevados de leptina (Huertas y cols., 2012), la leptina y su receptor principal se propone que contribuyen a la remodelación vascular, en particular en enfermedades cardiovasculares, actuando como un factor proliferativo y estimulador de la migración para células de musculo liso vasculares sistémicas y además promueve la infiltración de células inflamatorias de la pared vascular

por reclutamiento de monocitos de la íntima (Santos-Álvarez y cols., 1999) y macrófagos para la transformación de células espumosas y secreción adicional de citoquinas proaterogénicas que estimulan la hipertrofia vascular (Beltowski 2006), en la rata espontáneamente hipertensa que desarrolla HAP también se ha encontrado infiltración de leucocitos en las arterias y venas intrapulmonares que presentan un alto grado de hipertrofia (Aharinejad y cols., 1996). Otro mecanismo implicado es el aumento en la señalización de la endotelina-1, en la rata SH que genera HAP se han encontrado niveles elevados de endotelina-1 y mayor expresión del receptor ETA en musculo liso de arterias pulmonares, además de aumento en la reactividad vascular a la endotelina-1 en arterias intrapulmonares (Gomart y cols., 2014). La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoactivo que contribuye a la hipertrofia vascular, a través de la activación de dos subtipos de receptores, el ET-A y ET-B que están acoplados a proteínas G. La activación del receptor a ET-1 da como resultado la estimulación de varias vías de señalización, incluidas las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K) y la proteína cinasa B (PKB) y un papel importante en la regulación del Ca²⁺, estos mecanismos están relacionados con la regulación de la hipertrofia vascular, el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular (Sandoval y cols., 2014).

Mientras que en la HAP por monocrotalina el mecanismo que se propone es que este es metabolizado en el hígado por el sistema microsomal CYP P450 (CYP3A4) produciendo un metabolito toxico el dihidro-monocrotalina (Chesney y Allen, 1973), este metabolito se ha mostrado que daña específicamente las células endoteliales pulmonares. El mecanismo por el cual produce el daño endotelial no está totalmente clarificado, pero se propone que las células endoteliales de las arterias pulmonares expuestas a dihidro-monocrotalina desarrollan megalocitosis caracterizada por un aparato de Golgi agrandado, lo que ocasiona una disminución del tráfico de proteínas, desplazamiento de la sintasa de óxido nítrico endotelial lejos de la membrana plasmática y la interacción óxido nítrico-caveola están disminuidos (Lee y cols., 2009). Las células endoteliales expuestas a monocrotalina demuestran alteraciones marcadas del tráfico de la membrana intracelular que afecta a varias proteínas de la membrana celular (Sehgal and Mukhopadhyay 2007). La pérdida de proteínas de membrana inducida por monocrotalina da como resultado la activación de factores proliferativos y antiapoptóticos y la desregulación de la señalización del óxido nítrico, lo que

lleva a hipertrofia vascular pulmonar severa (Huang y cols., 2010). Estos cambios estructurales de la arteria pulmonar en ambos modelos impactan directamente en la reactividad vascular a diferentes agentes vasoactivos, como se ha mostrado en modelos animales de hipertensión pulmonar, ya que existe aumento en la reactividad vascular pulmonar a agentes vasoconstrictores y una disminución en la respuesta a agentes vasodilatadores. De acuerdo con eso, los estudios en modelos animales sugieren que la vasodilatación pulmonar dependiente de ON está alterada en la hipertensión pulmonar (Budhiraja y cols., 2004).

16.1 Reactividad vascular a fenilefrina y acetilcolina.

Al evaluar la reactividad vascular a fenilefrina un agonista del receptor α -1-adrenérgico encontramos una disminución en la contracción en los anillos de arteria pulmonar de las ratas con HAP tanto espontánea como por monocrotalina respecto a su control, pero algo interesante es que en el grupo de monocrotalina encontramos una mayor disminución en la contracción que el grupo de HAP espontánea y también se requiere mayor concentración de fármaco para inducir contracción en el grupo de monocrotalina que el grupo con HAP espontánea sugiriendo que los mecanismos de señalización adrenérgicos que involucran al receptor (menor número de receptores y desensibilizados) están más alterados en este grupo. Existen reportes que indican que la contracción inducida con fenilefrina está reducida en la arteria pulmonar de ratas administradas con monocrotalina (Mam y cols., 2010; Christou y cols., 2012) lo que corrobora nuestros resultados, no así en el caso de la HAP espontánea en donde existe la evidencia de que la contractilidad inducida con fenilefrina está mejorada en estas ratas (Gomart y cols., 2014) esta contradicción podría deberse al tipo de preparación que se utilizó, mientras que ellos utilizaron las arterias intralobares de resistencia nosotros utilizamos el tronco de la arteria pulmonar que es un vaso de conductancia.

Esta regulación a la baja de los receptores α -adrenérgicos podría deberse a que se ha demostrado que durante la HAP existe una liberación aumentada de catecolaminas (Adrenalina y noradrenalina) en la circulación pulmonar por lo cual existe incremento en la señalización adrenérgica que involucra a los receptores α y β adrenérgicos. Sin embargo, si este evento se mantiene en el tiempo en niveles lo suficiente altos como para producir

desensibilización a la señalización de adrenérgica a través de las vías de señalización dependientes de la proteína cinasa A (PKA) (Mak y cols., 2012).

La disminución de la respuesta contráctil en el modelo de HAP también se ha reportado que puede deberse a alteraciones en los mecanismos de señalización después de que se activa el receptor $\alpha 1$ -adrenérgico (Mam y cols., 2010), una de las vías que se ha reportado esta disminuida en la HAP por monocrotalina es la vía RhoA/ROCK que está involucrada en la contracción del músculo liso producida por varios agonistas entre ellos la fenilefrina. También se ha reportado una regulación a la alta de los canales de potasio BK_{ca} ocasionando hiperpolarización de la membrana de las células de musculo liso y por consecuencia disminuye la entrada de calcio, este mecanismo se explica como un mecanismo compensatorio ante el aumento de la resistencia vascular (Dai y cols., 2010).

Además de la vasoconstricción alterada, también la relajación esta alterada en la HAP. En nuestro trabajo la relajación de la arteria pulmonar con endotelio esta disminuida en las ratas con HAP espontánea y por monocrotalina, siendo más deteriorada la relajación en el grupo de monocrotalina que en el grupo de HAP espontanea, estos resultados se correlacionan con los encontrados por otros autores, en donde también la relajación inducida con acetilcolina esta disminuida (Altiere y cols., 1986; Mathew y cols., 1995; Packer y cols., 2003, Mam y cols., 2010; Sirmagul y cols., 2013). Esta disminución de la relajación se debe a la disfunción de las células endoteliales, desempeñando un papel integral en la patogénesis de la HAP en humanos como en modelos animales (Peled y cols., 2008). Esta disfunción endotelial se caracteriza por una sobreproducción de vasoconstrictores, factores proliferativos, como la endotelina-1, y una reducción de los factores vasodilatadores, antiproliferativos, como el óxido nítrico (ON), ya que se ha encontrado una disminución de la eNOS en las ratas con monocrotalina (Varshney y cols., 2016). El potente efecto vasodilatador y el efecto antiproliferativo del ON está mediado por su segundo mensajero, el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), en el sistema pulmonar (O'Callaghan y cols., 2010). Esta disfunción endotelial en la rata se ve reflejada en la disminución de la relajación dependiente de endotelio como nosotros la encontramos en estos modelos.

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad grave con un mal pronóstico. En los pacientes no tratados, hay un aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar

que conduce a fracaso ventricular derecho intratable y muerte prematura. El período mediano de supervivencia después del diagnóstico es de aproximadamente 2-3 años. A pesar de las grandes mejoras recientes en los tratamientos sintomáticos, ningún tratamiento actual cura esta condición devastadora. Por lo tanto, en este estudio nos centramos en el estudio de la presencia y la función fisiológica de los receptores dopaminérgicos en la HAP espontánea y por monocrotalina para mostrar evidencia de una posible nueva estrategia terapéutica para la hipertensión pulmonar.

16.2 Reactividad vascular a receptores dopaminérgicos.

16.3 Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D₁ el SKF 38393

En este estudio encontramos que la estimulación del receptor dopaminérgico D₁ produce relajación dependiente y en menor medida independiente de endotelio de la arteria pulmonar de ratas control, lo que sugiere que este receptor está presente en endotelio y en músculo liso de este lecho vascular, este resultado de producir relajación de arterias pulmonares se correlaciona con lo reportado por Hoshino y cols., 1986; Mori y cols., 1988. Esta relajación producto de la estimulación del receptor D₁ esta atenuada en la HAP espontánea y por monocrotalina, esta disminución puede deberse a una regulación a la baja de este receptor similar a lo encontrado por Jinjuan y cols., 2014 en arterias mesentéricas de ratas con hipertensión arterial sistémica por síndrome metabólico, otro mecanismo implicado en esta alteración es por un aumento en la fosforilación de este receptor producto de la regulación a la alta de la MAPK lo que ocasiona un mal acoplamiento del receptor con la proteína Gs (Yoshizumi y cols., 2001).

En estudios de reactividad vascular la dopamina produce relajación en anillos intactos de la arteria pulmonar de conejo (Hoshino y cols., 1986; Mori y cols., 1988). Como esta reportado el receptor D₁ produce relajación en diferentes lechos vasculares, sin embargo, existen pocos estudios de reactividad vascular en el lecho vascular pulmonar normal y en la HAP.

16.4 Reactividad vascular al agonista dopaminérgico de la familia D2 la apomorfina.

En primer lugar, evaluamos la reactividad vascular con un agonista general de los receptores D2 (D₂, D₃ y D₄) la apomorfina y lo que encontramos es que en anillos de la arteria pulmonar con y sin endotelio de las ratas control produce una relajación potente y está disminuida en el grupo de monocrotalina y no hay cambios en de HAP espontanea. Se ha encontrado que la apomorfina causó relajación dependiente de la concentración en los anillos con endotelio de arteria pulmonar. También la bromocriptina, otro agonista dopaminérgico D2 produjo relajación en esta arteria (Yamauchi y cols., 1992).

Con la apomorfina mostramos que los receptores dopaminérgicos tienen una función fisiológica vasorelajadora muy importante en la arteria pulmonar, que se encuentran predominantemente en musculo liso y confirmamos la presencia de estos receptores en este lecho vascular como lo reportaron otros autores en humanos (Ricci y cols., 1992, Jin y cols., 1995) y conejo (Bruzzone y cols., 2002).

16.5 Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D₂ el Quinpirole.

La estimulación del receptor D₃ produce contracción de la arteria pulmonar por lo que proseguimos a estudiar al receptor D₂ y lo que encontramos fue que produce relajación de aproximadamente el 50 % de esta arteria, esta relajación es dependiente e independiente de endotelio lo que sugiere la presencia de receptores D₂ en endotelio y musculo liso. En la HAP espontanea se encuentra una la relajación disminuida lo que podría sugerir una disminución a la baja de este receptor.

16.6 Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D₃ el 7-OH-DPAT.

Estos resultados muestran la presencia y función fisiológica de este receptor dopaminérgico D₃ en la arteria pulmonar de ratas WistarKyoto e Hipertensa espontánea y corrobora lo reportado por otros autores donde encuentran a este receptor en las arterias pulmonares de humano (Ricci y cols., 2006) y en otros lechos vasculares (aorta y arterias mesentéricas) (Zeng y cols., 2004). También encontramos que la contracción por la

estimulación del receptor D₃ en la HAP espontánea y por monocrotalina esta disminuida, este efecto podría deberse por una regulación a la baja de este receptor como un mecanismo compensatorio ante el aumento de la resistencia vascular pulmonar en esta enfermedad.

Esta contracción inducida con el 7-OHDPAT podría estar relacionado con la señalización de la dopamina con el sistema serotoninérgico en este vaso. Gilbert y Goldberg 1975 encontraron que la contracción inducida por la dopamina en la arteria femoral de perro parecía estar mediada por un receptor estrechamente relacionado con los receptores de la serotonina en especial del receptor serotoninérgico 5HT_{2A} ya que al antagonizar a este receptor con la ciproheptadina disminuía a contracción inducida con dopamina. (Brown y cols., 1998; Kanai y cols., 1993; Wanstall y O'Donnell 1990).

La contracción de la arteria pulmonar también podría deberse a la estimulación de la dopamina a su receptor dopaminérgico D₃, en este estudio demostramos que la estimulación de este receptor con el agonista 7-OH-DPAT produce vasoconstricción concentración dependiente de la arteria pulmonar y este efecto no depende del endotelio, lo que sugiere que estos receptores se encuentran en el musculo liso. Este efecto se ha sustentado mediante el uso del antagonista de este receptor (U-99194A), el cual bloquea el efecto vasoconstrictor del 7-OH-DPAT en la aorta de ratas con hipertensión arterial espontanea (datos no publicados del laboratorio).

16.7 Reactividad vascular al agonista dopaminérgico D₄ el PD 168077.

La estimulación del receptor D₄ produjo una relajación importante de la arteria pulmonar no solo en los anillos con endotelio sino también en los anillos sin endotelio lo que sugiere que los receptores D₄ están presentes en mayor medida en musculo liso de esta arteria como esta reportado en aorta de rata (Yu y cols., 2014), para corroborar que el receptor D₄ está presente en la arteria pulmonar hicimos curvas dosis efecto con el agonista D₄ en presencia del antagonista y lo que encontramos es que se bloque el efecto en más del 50 % lo que demuestra que el efecto que vemos es por activación de este receptor. También es importante observar que a pesar de que existe una ligera disminución en la relajación en el grupo de monocrotalina, la relajación es más del 70 %, en el grupo de HAP la relajación fue casi del 100 %, esto nos lleva a pensar que en estos dos modelos de HAP el número y sensibilidad de este receptor no tiene una alteración significativa lo que podría ayudar a

disminuir la resistencia vascular pulmonar, lo que nos indica que el receptor D₄ juega un papel importante en la regulación de la arteria pulmonar y podría ser un blanco terapéutico importante para el tratamiento de esta enfermedad ya que también se ha demostrado que la estimulación de este receptor disminuye la migración e hipertrofia de células de músculo liso al producir una regulación a la baja del receptor AT₁ en un modelo de hiperinsulinemia (Yu y cols., 2014).

Los resultados hasta el momento muestran la presencia los receptores D₁, D₂, D₃ y D₄ y además que tienen una función en la contracción y relajación de esta arteria, siendo el que más tiene una repercusión el receptor D₄ ya que produce una relajación muy potente y no se modifica tanto en la HAP.

Nosotros en este trabajo evaluamos las concentraciones de óxido nítrico en la arteria pulmonar y lo que encontramos fue una disminución en los grupos con HAP en relación a su control. Esta disminución es producto de la disfunción endotelial y a la disminución en la biodisponibilidad de esta sustancia como esta reportado en la literatura. La disminución de los niveles de ON se correlacionan con lo reportado por Sungwon y cols., 2014, en donde ellos muestran niveles más bajos de ON y GMPc en un modelo de HAP por monocrotalina. También en la HAP en humanos se asocia con una producción alterada del vasodilatador derivado del endotelio, NO (McLaughlin y McGoon 2016). El NO actúa sobre las células del músculo liso para inducir la vasodilatación e inhibir la proliferación al aumentar la producción del mensajero secundario GMPc *mediante la* activación de la guanilatociclasa soluble (Ignarro y cols.,1987), esta disminución está relacionada con la hipertrofia de la arteria pulmonar en esta patología.

17 Conclusiones

- 1.- Los resultados sugieren la presencia de receptores DA (D_1, D_2, D_3 , y D_4) en arteria pulmonar, lo que corrobora lo reportado por otros autores, aunque lo importante es que esta identificación es por su función fisiológica.
- 2.- El efecto de la apomorfina (agonista D_2) tiene un claro efecto vasodilatador en anillos pulmonares con y sin endotelio. Este efecto predomina en las ratas con HAP espontánea.
- 3.- El efecto de los agonistas D_1 (SKF 38393) y D_2 (quinpirole) es un claro efecto vasodilatador en anillos pulmonares con endotelio, aunque el efecto es menor comparado con la apomorfina y el PD 168077, además tienen un mínimo efecto en los anillos pulmonares sin endotelio. Este efecto es menor en las ratas con HAP Espontánea y por monocrotalina.
- 4.- El agonista D_3 (7-OH-DPAT) produce vasoconstricción en anillos de arteria pulmonar de los cuatro grupos. Este efecto está disminuido en los anillos pulmonares de ratas con HAP Espontánea y por monocrotalina.
- 5.- El agonista D_4 (PD 168077) produce vasorelajación en anillos con y sin endotelio, el efecto máximo es muy similar al de la apomorfina. El efecto de este agonista es similar entre los anillos pulmonares con y sin endotelio en el grupo control. La relajación en los AP de las ratas con HAP espontánea y por monocrotalina es muy similar a sus controles.
- 6.- El efecto del agonista D_4 (PD 168077) sugiere que el receptor D_4 está presente en el endotelio, pero predominantemente en el músculo liso.
- 7.- Los niveles de ON están disminuidos en las AP de ratas con HAP espontánea y por monocrotalina.

Perspectivas

- Cuantificar NO₂ en la arteria pulmonar de los 4 grupos experimentales en presencia y a ausencia de los agonista dopaminergicos.
- Realizar Binding de membrana en la arteria pulmonar de los 4 grupos experimentales para conocer datos farmacológicos de los receptores dopaminérgicos.
- Realizar tinción inmunohistoquímica en la arteria pulmonar de los 4 grupos experimentales para identificar la localización de los receptores dopaminergicos.
- Administrar a ratas con hipertensión pulmonar agonistas de los receptores dopaminergicos para ver el efecto de estos en un modelo in vivo.

18 Bibliografía

1. Altieri RJ, Olson JW, Gillespie MN. 1986. Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 236:390-5.
2. Amenta F., Ferrante F., Rossodivita A. y Ricci A. 1992. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in human epicardial arteries. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 263:1447-1453.
3. Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. 2010. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation.* 121:2045-66.
4. Barst RJ, Oudiz RJ, Beardsworth A, Brundage BH, Simonneau G, Ghofrani HA, Sundin DP, Galiè N. 2011. Tadalafil monotherapy and as add-on to background bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 30:632-43.
5. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, Liou TG, McGoon MD. 2010. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation.* 122:164-72.
6. Bogaard H, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel N. 2009. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest.* 135:794-804.
7. Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, et al. 1992. Beta-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest.* 89:803-15.
8. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. 1998. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:108-115.
9. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation.* 109:159-65.
10. Cella G, Bellotto F, Tona F, Sbarai A, Mazzaro G, Motta G, Fareed J. 2001. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Chest.* 120:1226-30.
11. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 327:70-5.
12. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. 1992. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 327:70-5.
13. Christou H, Reslan OM, Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Touma M, Arons E, Mitsialis SA, Kourembanas S, Khalil RA. 2012. Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302:L875-90.

14. Csiszar A, Labinsky N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z. 2009. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*. 54:668-75.
15. D'Alessandro A, El Kasmi KC, Plecítá-Hlavatá L, Ježek P, Li M, Zhang H, Gupte SA, Stenmark KR. 2018. Hallmarks of Pulmonary Hypertension: Mesenchymal and Inflammatory Cell Metabolic Reprogramming. *Antioxid Redox Signal*. 28:230-250.
16. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M & Hubalek F. 2004. Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem*. 11:1983–1993.
17. Fang YH, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, Rehman J, Archer SL. 2012. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. *J Mol Med (Berl)*. 90:31-43.
18. Farber HW y Loscalzo J. 2004. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J*. 14:1655-65.
19. Francis S. 1995. Receptor systems involved in norepinephrine release in heart failure: focus on dopaminergic systems. *Clin. Cardiol*. 18:I-13- I-16.
20. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M y Hoeper M. 2015. [2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension]. *Kardiol Pol*. 73:1127-206.
21. George M, MD, Schieb L, Ayala C, Talwalkar A y Levant S. 2014. Pulmonary Hypertension Surveillance United States, 2001 to 2010. *Chest*. 146: 476–495.
22. Goldberg LI, Rajfer SI. 1985. Dopamine receptors: applications in clinical cardiology. *Circulation*. 72:245-8.
23. Greyson CR. 2010. Acute pulmonary hypertension: what is wrong on the right?. *Crit Care Med*. 38:1486-7.
24. Grossman W, Paulus WJ. 2013. Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling. *J Clin Invest*. 123:3701-3.
25. Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Droux P, Drouet L. 1995. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 99:249-54.
26. Hoffman BB, Lefkowitz RJ. 1982. Adrenergic receptors in the heart. *Annu Rev Physiol*. 44:475-84.
27. Hopkins, N.and McLoughlin, P. (2002). The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis?. *Journal of anatomy*, 201:335–348.
28. Humbert M. 2010. Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev*. 19: 59-63.

29. Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Morioka S, Moriyama K. 1991. Biventricular down-regulation of beta-adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Jpn Circ J.* 55:1077-85.
30. Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, Kyotani S, Oya H, Sakamaki F, Kimura H, Nakanishi N. 2006. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* 11:158-63.
31. Jing ZC, Xu XQ, Han ZY, Wu Y, Deng KW, Wang H, Wang ZW, Cheng XS, Xu B, Hu SS, Hui RT y Yang YJ. 2007. Registry and survival study in chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Chest.*132:373-9.
32. Jones R. 1992. Ultrastructural analysis of contractile cell development in lung microvessels in hyperoxic pulmonary hypertension. Fibroblasts and intermediate cells selectively reorganize nonmuscular segments. *Am J Pathol.* 141: 1491–1505.
33. Kanai Y, Hori S, Tanaka T, Yasuoka M, Watanabe K, Aikawa N, Hosoda Y. 1993. Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res.* 27:1619–1623.
34. Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, Thomassen MJ, Erzurum SC. 1998. Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:917-23.
35. Kebejian J, Calne D. Multiple receptor for dopamine. 1979. *Nature* 227:93-96.
36. Kim E, Seftel A, Goldfischer E, Baygani S, Burns P. 2015. Comparative efficacy of tadalafil once daily in men with erectile dysfunction who demonstrated previous partial responses to as-needed sildenafil, tadalafil, or vardenafil. *Curr Med Res Opin.* 31:379-89.
37. Klinger JR, Thaker S, Houtchens J, Preston IR, Hill NS, Farber HW. 2006. Pulmonary hemodynamic responses to brain natriuretic peptide and sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 129:417-25.
38. Kumar R, Mickael C, Kassa B, Gebreab L, Robinson JC, Koyanagi DE et al. 2017. TGF- β activation by bone marrow-derived thrombospondin-1 causes Schistosoma- and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Nat Commun.* 8:15494.
39. Kurzyna M, Zylkowska J, Fijałkowska A, Florczyk M, Wieteska M, Kacprzak A et al., 2008. Characteristics and prognosis of patients with decompensated right ventricular failure during the course of pulmonary hypertension. *Kardiol Pol.* 66:1033-9;
40. Lachowicz J, Sibley D. 1997. Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol* 81:105-113.
41. Lai Y, Potoka K, Champion H y Gladwin M. 2014. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. *Circ Res.* 20: 115–130.
42. Landsberg JW, Yuan JX. 2004. Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation. *News Physiol Sci.* 19:44-50.

43. Lucas M, Jasmin JF, Dupuis J. 2001. Effect of ET(A) receptor antagonist on pulmonary hypertension and vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Pulm Pharmacol Ther.* 14:307-14.
44. Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou HA, Khalil RA. 2010. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 332: 455–462.
45. Matori H, Umar S, Nadadur RD, Sharma S, Partow-Navid R, Afkhami M, Amjadi M, Eghbali M. 2012. Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats. *Hypertension.* 60:425-30.
46. Meyrick B, Reid L. 1979. Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. *Am J Pathol.* 96:51-70.
47. Missale C, Castelletti L, Memo M, Carruba M, Spano P. 1998. Identification and characterization of postsynaptic D1- and D2-dopamine receptors in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Pharmacol* 11:643-50.
48. Missale C., Castelletti L., Mema M., Carruba O. M. y Spano P. 1988. Identification and characterization of postsynaptic D1 and D2 dopamine receptors in the cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11:643-650.
49. Morales-Blanhir JE, Carmona-Rubio AE, Rosas-Romero Mde J, Vergara de Márquez GS y Arbo-Oze-de-Morvil GA. 2014. [Pulmonary arterial hypertension, a rare entity]. *Rev Invest Clin.* 66:65-78.
50. Namkung Y, Sibley D. 2004. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279: 49533-49541.
51. Nootens M, Kaufmann E, Rector T, Toher C, Judd D, Francis GS, Rich S. 1995. Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J Am Coll Cardiol.* 26:1581-5.
52. Oikawa M, Kagaya Y, Otani H, Sakuma M, Demachi J, Suzuki J, Takahashi T, Nawata J, Ido T, Watanabe J, Shirato K. 2005. Increased [18F]fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *J Am Coll Cardiol.* 45:1849-55.
53. Piao L, Marsboom G, Archer SL. 2010. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *J Mol Med (Berl).* 88:1011-20.
54. Pietra GG. 1994. Histopathology of primary pulmonary hypertension. *Chest.* 1994. 105:2S-6S.
55. Poiani GJ, Tozzi CA, Yohn SE, Pierce RA, Belsky SA, Berg RA, Yu SY, Deak SB, Riley DJ. 1990. Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Circ Res.* 66:968-78.
56. Ricci A., Collier L. W. y Amenta F. 1994. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *J. Auton. Pharmacol.* 14: 61-68.

57. Ricci GL, Melgosa MT, Burgos F, Valera JL, Pizarro S, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barberà JA. 2007. Assessment of acute pulmonary vascular reactivity in portopulmonaryhypertension. *LiverTranspl.* 13:1506-14.
58. Ricci GL, Melgosa MT, Burgos F, Valera JL, Pizarro S, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barberà JA. 2007. Assessment of acute pulmonary vascular reactivity in portopulmonaryhypertension. *LiverTranspl.* 13:1506-14.
59. Ryan JJ, Archer SL. 2014. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res.* 115:176-88.
60. Ryan JJ, Huston J, Kutty S, Hatton ND, Bowman L, Tian L, Herr JE, Johri AM, Archer SL. 2015. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can J Cardiol.* 31:391-406.
61. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. 2005. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* 19:1178-80.
62. Sandoval Zarate J, Jerjes-Sanchez C, Ramirez-Rivera A, Zamudio TP, Gutierrez-Fajardo P, Elizalde Gonzalez J, Leon MS, Gamez MB, Abril FM, Michel RP y Aguilar HG. Mexican registry of pulmonary hypertension: REMEHIP. 1993. *Arch Cardiol Mex.* 2017. 87:13-17.
63. Skoro-Sajer N, Hack N, Sadushi-Koliçi R, Bonderman D, Jakowitsch J, Klepetko W, Hoda MA, Kneussl MP, Fedullo P, Lang IM.
64. Skoro-Sajer N, Mittermayer F, Panzenboeck A, Bonderman D, Sadushi R, Hitsch R, Jakowitsch J, Klepetko W, Kneussl MP, Wolzt M, Lang IM. 2007. Asymmetric dimethylarginine is increased in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 176:1154-60.
65. Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G. 2012. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension.* 60:129-36.
66. Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, Tuder RM. 2018. Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 114:551-564.
67. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. 1991. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?. *Ann Intern Med.* 114:464-9.
68. Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, Zervopoulos S, Haromy A, Nagendran J, Michelakis ED. 2013. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl).* 91:1315-27.
69. Sutendra G, Michelakis ED. 2014. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab.* 9:558-73.
70. Tuder R, Abman S, Braun T, Capron F, Stevens T, Thistlethwaite P y Haworth S. 2009. Development and pathology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54: S3-9.

71. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. 1999. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1925-32.
72. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. 1994. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 144:275-85.
73. Tuder RM. 2009. Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med.* 30:376-85.
74. Uren NG, Ludman PF, Crake T, Oakley CM. 1992. Response of the pulmonary circulation to acetylcholine, calcitonin gene-related peptide, substance P and oral nicardipine in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 19:835-41.
75. Usui S, Yao A, Hatano M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K. 2006. Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 70:1208-15.
76. Van de Veerdonk M, Kind T, Marcus J, Mauritz G, Heymans M, Bogaard H, Boonstra A, Marques K, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. 2011. Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. *J Am Coll Cardiol.* 58:2511-9.
77. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. 2012. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J.* 40:1555-65.
78. Wanstall JC, O'Donnell SR. 1990. Endothelin and 5-hydroxytryptamine on rat pulmonary artery in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 176:159–168.
79. Wanstall JC1, O'Donnell SR. 1989. Vasodilator responses to dopamine in rat perfused mesentery are age-dependent. *Br J Pharmacol.* 98:302-8.
80. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Galaria II, Harvey JL, Miller CM, Blaxall BC, Hall CM, Pierce RA, Cool CD, Taubman MB. 2007. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:L583-90.
81. Yamaki S. 2004. Pulmonary vascular disease associated with pulmonary hypertension in 445 patients: diagnosis from lung biopsy and autopsy. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 61:24-31.
82. Yatsu T., Takizawa K., Kasai-Nakagawa C., Uchida W., Tanaka A., Asano M, Hoda K. y Takenaka T. 1997. Hemodynamic Characterization of YM435, a novel dopamine DA1 receptor agonist, in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29:382-388.
83. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. 2007. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 112:583-97.

84. Zhang R, Dai LZ, Xie WP, Yu ZX, Wu BX, Pan L, Yuan P, Jiang X, He J, Humbert M yJing ZC.2011. Survival of Chinese patients with pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. Chest.140:301-309

Anexo 1

Regulación del tono vascular de la circulación pulmonar en condiciones normales

Regulación pasiva.

En la circulación pulmonar, se llevan a cabo mecanismos tanto pasivos como activos. Dentro de los mecanismos pasivos se producen dos procesos importantes en la regulación de la vasculatura pulmonar.

Uno es el reclutamiento y distensión de los vasos pequeños (arteriolas, capilares y Vénulas) (Berne RM. y cols., 1998). Esto es bajo condiciones normales, cuando la presión auricular derecha es baja, en este proceso algunos vasos pulmonares están abiertos y conducen sangre, otros están abiertos, pero no conducen sangre y otros vasos sanguíneos están cerrados. A medida que aumenta la presión, los vasos sanguíneos que estaban abiertos, pero no conducían sangre ahora empiezan a conducir sangre, y algunos vasos que estaban completamente cerrados ahora pueden abrirse. Este reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos ayuda a disminuir la resistencia vascular pulmonar y cualquier dilatación adicional de estos vasos causará una reducción adicional de la resistencia pulmonar general. Esta notable capacidad

para reducir aún más la resistencia vascular pulmonar hace posible que cuando el gasto cardíaco aumenta no se produzca un incremento tan grande en la presión media de la arteria pulmonar (Boron WF. y cols., 2005).

El ejercicio produce un aumento de la presión auricular izquierda que es progresiva a la intensidad del ejercicio y explica la mayor parte del aumento de la presión que se puede observar. Para que los pulmones realicen su intercambio de gases eficazmente, la circulación pulmonar debe mantener una presión pulmonar arterial y capilar sin muchos cambios mientras se acomoda el aumento del gasto cardíaco (McLaughlin, VV. Y cols., 2004).

Regulación activa

Hay una gran cantidad de influencias vasoconstrictoras o vasodilatadoras que causan regulación de la vasculatura pulmonar, en específico en la contracción o relajación de las células del músculo liso. Las células del músculo liso vascular se alinean en la pared arterial justo debajo de las células endoteliales. Son células altamente especializadas cuyas principales funciones son la contracción y la relajación (Hilgers RH. Y cols., 2005). Expresan una variedad de proteínas contráctiles, canales iónicos y responden a señales de moléculas que regulan la contracción. La contracción y relajación de las células musculares lisas son causadas por un aumento o disminución del calcio intracelular respectivamente, o por desactivación y activación respectivamente de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. La fosfatasa de la cadena ligera de la miosina actúa para cambiar el tono vascular. La membrana celular es permeable a una serie de iones, los más importantes son Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Estos iones atraviesan la membrana a través de canales específicos que pueden abrirse (activarse) y cerrar (se inactivan). Su apertura y cierre pueden ocurrir en respuesta a 1) cambios de voltaje (canales de voltaje), 2) activación de receptores (canales), o especificaciones o ligandos.

Es importante destacar que hay varios tipos diferentes de canales K^+ que juegan un papel importante en el potencial de reposo de la membrana y en los potenciales de acción. La activación de estos canales de K^+ desencadena una disminución en el potencial de la membrana (hiperpolarización), ocasionando disminución en el Ca^{2+} intracelular, causando así relajación del músculo liso y por lo tanto vasodilatación.

Muchas sustancias vasoactivas influyen en la resistencia vascular pulmonar produciendo segundos mensajeros como el AMPc y / o GMPc, que puede causar una disminución del Ca^{2+}

+ intracelular. Estos segundos mensajeros duran poco porque se degradan por las enzimas fosfodiesterasas (PDE). La inhibición de la PDE en el músculo liso vascular pulmonar puede proporcionar una poderosa herramienta para reducir la resistencia vascular, prolongando la semivida del AMPc y / o GMPc.

Células endoteliales.

Las células endoteliales interactúan con las células del músculo liso presentes en la pared vascular por un lado y con células circulantes por otro lado. Las células endoteliales pueden producir diferentes vasodilatadores (es decir, óxido nítrico (NO), prostaciclina(PGI₂), factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF)) y vasoconstrictores(Endotelina (ET)) en respuesta a estímulos fisiológicos como el estrés por cizallamiento.

El tejido pulmonar es particularmente activo en la síntesis, el metabolismo y la liberación de una serie de prostaglandinas, que pueden desempeñar un papel en la regulación de la resistencia vascular pulmonar. Las isoenzimas ciclooxigenasa (COX) -1 y -2 catalizan la conversión de ácido araquidónico en tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaglandinas (PGs). Las prostaglandinas I₂ (PGI₂) y E₁ (PGE₁) están activas y producen vasodilatación pulmonar, mientras que la PGF₂ α y PGA₂ son vasoconstrictores pulmonares (Vane JR. Y cols., 1990). El Óxido nítrico(ON) es otro agente vasoactivo sintetizado por el endotelio que juega un papel importante como un vasodilatador (Duncker DJ. Y cols ., 2000). Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina y por acción de la sintasa del ON (NOS), existen 3 isoformas: la NOS inducible(iNOS), una isoforma, expresada principalmente por macrófagos, la NOS neuronal (nNOS), una isoforma expresada por las neuronas, y la NOS endotelial (eNOS). La eNOS es dependiente del calcio y se expresa ampliamente en el endotelio pulmonar de los mamíferos (Fonseca JC. Y cols., 2004). El NO actúa a través de guanosinamono fosfato cíclico (GMPc) para regular los canales de potasio y tiene un efecto muy localizado. Si el NO se difunde a la sangre circulante, se une inmediatamente e irreversiblemente al hierro en la hemoglobina. Por lo tanto, su acción está estrictamente localizada en el lecho vascular en el que está producido (Berne RM. Y cols., 1998).

Control neurohumoral.

La vasculatura pulmonar expresa alfa (α) y beta (β) Adrenoreceptores, que ayudan a regular el tono vascular mediante la generación de vasoconstricción o vasodilatación,

respectivamente (Salvi SS. Y cols., 1998). Estos receptores se unen principalmente a noradrenalina que se libera de los nervios adrenérgicos simpáticos. Además, también se unen a noradrenalina y adrenalina que circula en la sangre. El músculo liso tiene dos tipos principales de α -adrenoceptores: alfa1 (α_1) y alfa2 (α_2).

Los α_1 -adrenoceptores se localizan en el músculo liso vascular. A diferencia de, los α_2 -adrenoceptores se encuentran en las terminales nerviosas simpáticas, así como en el músculo liso vascular. Los α_1 y α_2 adrenoceptores del músculo liso están unidos a proteínas G, que activa la contracción del músculo liso. Los receptores α_2 -Adrenérgicos se localizan en las terminales de los nervios simpáticos y sirven como mecanismo de retroalimentación para la liberación de noradrenalina (Bevan RD. Y cols., 1989) Los eventos de señalización que se desencadenan por la activación de los receptores α_1 -adrenérgico es el aumento de los niveles de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa, que median respuestas contráctiles y proliferativas vasculares. Este mecanismo en las arterias pulmonares puede facilitar en gran medida la regulación local del tono vascular en cambios agudos en las concentraciones de oxígeno, ajustando así la perfusión regional.

Existen dos subtipos de receptores β -adrenérgicos, β_1 y β_2 -adrenérgico. Las células del músculo liso vascular tienen al receptor β_2 -adrenérgico que están acoplados a una proteína G_s , que estimula la formación de AMPc., el aumento del AMPc intracelular causado por los agonistas β_2 -adrenérgico inhiben la cinasa de la cadena ligera de la miosina, produciendo con ello la relajación vascular.

La angiotensina II, el péptido efector del sistema renina-angiotensina (Ruiz-Ortega M. 2005) causa vasoconstricción. Se genera en el pulmón por medio de la enzima convertidora de angiotensina I (Braunwald E. y cols., 2004) [46]. Se une a dos subtipos específicos de receptores a angiotensina, los receptores AT1 Y AT2. AT1 predomina en los tejidos vasculares pulmonares y contribuye a las enfermedades crónicas promoviendo la proliferación celular, procesos inflamatorios y fibrosis, mientras que AT2 se expresa en condiciones patológicas y está involucrado en vasodilatación y apoptosis (Ruiz-Ortega M. 2005).

La serotonina (5-HT), es un componente importante de la densidad de los gránulos en las plaquetas y se libera tras la activación de estas. La serotonina puede ser un vasodilatador vascular, pero es un vasoconstrictor que promueve la hipertrofia de las células del músculo

liso e hiperplasia en la vasculatura dañada. Las células endoteliales normales responden a serotonina mediante el aumento de la liberación de NO, lo que conduce a la relajación del músculo liso. En el contexto de la disfunción endotelial, la serotonina es incapaz de estimular la liberación de NO y aumenta el tono del músculo liso, lo que conduce a la vasoconstricción (Fanburg BL. 1997).

Los receptores de serotonina se clasifican en 7 tipos, cada tipo puede tener subtipos A, B y así sucesivamente. La vasoconstricción ocurre cuando la 5-HT se une a los receptores 5-HT. Los receptores a serotonina se expresan en abundancia en la vasculatura pulmonar, donde se encuentran predominantemente en la arteria pulmonar de células del músculo liso (McLean MR. Y cols., 1996).