



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EXPRESIÓN DE RECEPTORES A Y B DE ENDOTELINA-1 Y
PREPROENDOTELINA-1 EN PULMÓN DE RECIÉN NACIDOS
DE OVEJA Y LLAMA DE TIERRAS BAJAS Y ALTAS**

IRMA LUZ VALENZUELA OSORIO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR ROBERTO REYES CATALÁN

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EXPRESIÓN DE RECEPTORES A Y B DE ENDOTELINA-1 Y PREPROENDOTELINA-1 EN PULMÓN DE RECIÉN NACIDOS DE OVEJA Y LLAMA DE TIERRAS BAJAS Y ALTAS

IRMA LUZ VALENZUELA OSORIO

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: VÍCTOR R. REYES CATALÁN
PROFESOR CONSEJERO: VÍCTOR H. PARRAGUEZ GAMBOA
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE
2008

Esta Memoria de Título fue financiada gracias a los proyectos FONDECYT 1010636 y 1050479 (Investigador responsable: Doctor Jorge Aníbal Llanos Mansilla y coinvestigador: Víctor Roberto Reyes Catalán) y 1020599 (Investigador responsable: Víctor Roberto Reyes Catalán y coinvestigador: Doctor Aníbal Llanos Mansilla) de Chile y *The Wellcome Trust CRIG* 072256 (Investigador responsable: Doctor Jorge Aníbal Llanos Mansilla y coinvestigador: Víctor Roberto Reyes Catalán) de Reino Unido.

DEDICATORIA

A mi papá, mamá y hermana, por el amor y dedicación que me han brindado,
por los valores que me han inculcado y enseñarme a apreciar lo que tengo.

Por su paciencia y apoyo incondicional durante mi vida
y alegrarse con mis alegrías.....

gracias

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a Roberto Reyes, mi profesor guía, por su apoyo y constante preocupación durante la realización de este trabajo y que fue fuente de energía para la finalización del mismo. También al doctor Aníbal Llanos por acogerme en el laboratorio y permitirme la realización de este trabajo y por su importante aporte a mi formación profesional.

Agradezco a la doctora Raquel Riquelme por la disposición de ayuda profesional y humana que siempre me brindó.

A los señores Carlos Brito y Mario Morales por su invaluable e inolvidable colaboración.

También quiero agradecer a Francisco Valenzuela y Germán Ebensperger, quienes prestaron asesoría en el diseño y desarrollo de la metodología utilizada en Biología Molecular.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. CIRCULACIÓN PULMONAR EN ANIMALES ADULTOS.....	4
2.1.1. Vasoconstricción pulmonar hipóxica.....	5
2.2. CIRCULACIÓN CARDIOPULMONAR EN FETOS.....	7
2.2.1. Rol del endotelio vascular pulmonar fetal.....	9
2.3. ADAPTACIÓN DE LA CIRCULACIÓN CARDIOPULMONAR DURANTE LA TRANSICIÓN DE FETO A RECIÉN NACIDO.....	10
2.3.1. Falla en la adaptación de la circulación pulmonar durante el periodo de transición e Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido.....	12
2.4. SISTEMA DE ENDOTELINAS.....	14
2.4.1. Sistema de endotelinas y circulación pulmonar.....	16
2.4.2. Rol de la ET-1 en Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido.....	17
2.5. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA EN EL PERÍODO PERINATAL.....	17
2.6. ROL DEL SISTEMA DE ENDOTELINAS EN HIPERTENSIÓN PULMONAR HIPÓXICA CRÓNICA.....	21
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. MODELO EXPERIMENTAL.....	25
6.2. PROTOCOLO DE DISECCIÓN Y OBTENCIÓN DE TEJIDOS.....	26
6.3. RT-PCR SEMICUANTITATIVO.....	26
6.3.1. Extracción de RNA total.....	26
6.3.2. Síntesis de cDNA.....	28
6.3.3. Amplificación de secuencias parciales de cDNA mediante PCR.....	30
6.4. <i>INMUNOBLOT</i>	32
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
8. RESULTADOS	37
8.1. Peso y edad de ovejas y llamas recién nacidas.....	37
8.2. Cuantificación y análisis electroforético de RNA total.....	37
8.3. Verificación de calidad de la síntesis de cDNA.....	39
8.4. Determinación del número de ciclos de amplificación para PCR semicuantitativa.....	40
8.5. Expresión de transcritos de PPET-1, ET _A y ET _B en recién nacidos de tierras bajas y altas.....	43
8.6. Ensayos de <i>Inmunoblot</i>	46
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	57
11. BIBLIOGRAFÍA	58

GLOSARIO

- BigET-1: Bigendotelina-1
- BigET-2: Bigendotelina-2
- BigET-3: Bigendotelina-3
- cDNA: o DNA complementario es DNA sintetizado a partir de RNA maduro en una reacción catalizada por una enzima transcriptasa reversa
- ECE-1: enzima convertidora de endotelina-1
- ET-1: endotelina-1
- ET-2: endotelina-2
- ET-3: endotelina-3
- ET_A: receptor de endotelina A
- ET_B: receptor de endotelina B
- HRE: Elemento de Respuesta a Hipoxia, en inglés, Hypoxia Response Element
- HIF-1: Factor Inducible por Hipoxia-1, en inglés, Hypoxia Inducible Factor-1
- HPPRN: Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido
- LLRNTB: llama recién nacida de tierras bajas
- LLRNTA: llama recién nacida de tierras altas
- m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar
- PaO₂: presión parcial de oxígeno arterial
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, en inglés, Polymerase Chain Reaction
- PPET-1: preproendotelina-1
- PPET-2: preproendotelina-2
- PPET-3: preproendotelina-3
- RT-PCR: Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa, en inglés, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
- OVRNTB: oveja recién nacida de tierras bajas
- OVRNTA: oveja recién nacida de tierras altas

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representación esquemática de RT-PCR.....	29
Figura 2: Representación esquemática de <i>immunoblot</i>	33
Figura 3: Análisis electroforético de rRNA 18S y 28S.....	39
Figura 4: Verificación de transcripción reversa por amplificación de secuencia parcial del gen 18SrRNA.....	40
Figura 5: Número de ciclos de amplificación para un fragmento de los genes 18SrRNA, PPET-1, ET _A y ET _B en pulmón de ovejas recién nacidas.....	41
Figura 6: Número de ciclos de amplificación para un fragmento de los genes 18SrRNA, PPET-1, ET _A y ET _B en pulmón de llamas recién nacidas.....	42
Figura 7: Expresión del mRNA de PPET-1, ET _A y ET _B en pulmón de ovejas recién nacidas.....	44
Figura 8: Expresión del mRNA de PPET-1, ET _A y ET _B en pulmón de llamas recién nacidas.....	45
Figura 9: Ensayo de <i>immunoblot</i> de receptores ET _A y ET _B en pulmón de ovejas recién nacidas.....	47
Figura 10: Ensayo de <i>immunoblot</i> de receptores ET _A y ET _B en pulmón de llamas recién nacidas.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Secuencia de los partidores y condiciones usadas para el PCR semicuantitativo.....	30
Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados.....	35
Tabla 3: Cuantificación espectrofotométrica de RNA total.....	38

RESUMEN

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoactivo producido principalmente por el endotelio vascular. La ET-1 estimula la contracción y tiene acción mitogénica en la célula muscular lisa vascular al unirse a su receptor ET_A muscular, mientras que la unión del péptido al receptor ET_B endotelial promueve vasodilatación, participando ambos receptores en la regulación del tono vascular. La alteración del sistema ET-1 y de sus receptores puede tener un profundo impacto en la regulación de la presión arterial pulmonar durante la transición desde la vida fetal a la vida extrauterina, bajo condiciones de hipoxia crónica. **Hipótesis:** existiría una mayor expresión del precursor de ET-1, preproendotelina-1 (PPET-1) y del receptor ET_A y una menor expresión del receptor ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas crónicamente hipóxicas, gestadas y nacidas en tierras altas, que desarrollan hipertensión arterial pulmonar, en comparación con ovejas recién nacidas gestadas y nacidas en tierras bajas. Estos cambios no se observarían en llamas recién nacidas, especie tolerante a la hipoxia crónica, en la que la gestación y nacimiento en tierras altas no genera hipertensión arterial pulmonar. **Objetivo:** comparar la expresión de PPET-1 y receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas de tierras bajas y altas. **Método:** evaluar la expresión de PPET-1 y de receptores ET_A y ET_B a nivel de mRNA por RT-PCR semicuantitativo y a nivel proteico para ambos receptores por *immunoblot*, en pulmón de ovejas recién nacidas de tierras bajas (n=5) y altas (n=6) y de llamas recién nacidas de tierras bajas (n=6) y altas (n=5). **Resultados:** a nivel de mRNA, la expresión de PPET-1 y de los receptores ET_A y ET_B aumentó en ovejas recién nacidas de tierras altas en comparación con el grupo de tierras bajas. Por otra parte, no hubo diferencias en la expresión de estos mRNA entre llamas recién nacidas de tierras bajas y altas. La expresión de estos receptores a nivel de proteína no pudo ser determinada debido a que los anticuerpos ensayados no permitieron la detección específica de los receptores en los pulmones de ambas especies. **Conclusión:** el aumento de expresión pulmonar del sistema de ET-1 podría estar implicado en el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar observado en ovejas recién nacidas crónicamente hipóxicas, mientras que la capacidad de mantener sin cambios este sistema en las llamas recién nacidas contribuiría a prevenir el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar en esta especie.

ABSTRACT

Endothelin-1 (ET-1) is a vasoactive peptide mainly produced by vascular endothelium. ET-1 binding to its ET_A receptor in vascular smooth muscle cell stimulates the contraction and has mitogenic action in the myocyte whilst binding of this peptide to endothelial ET_B receptor promotes vasodilatation, participating in this way in the regulation of the vascular tone. Modifications of the ET-1 system and its receptors may have a deep impact in the regulation of the pulmonary arterial pressure during the transition from the fetal life to the extrauterine life, under chronic hypoxia conditions. **Hypothesis:** chronically hypoxic newborn sheep, which show pulmonary arterial hypertension as a result of gestation and birth at high altitude, should have a greater pulmonary expression of the ET-1 precursor, preproendothelin-1 (PPET-1), and its ET_A receptor, and a lower pulmonary expression of its ET_B receptor, compared to control newborn sheep gestated and born at lowland. These changes would not be observed in newborn llama, specie tolerant to chronic hypoxia that does not develop pulmonary arterial hypertension after gestation and birth at high altitude. **Aim:** to compare PPET-1, and ET_A and ET_B receptor expression in lung from lowland and highland newborn sheep and llama. **Method:** to evaluate PPET-1, and ET_A and ET_B receptors expression in lung at mRNA level by semiquantitative RT-PCR and at protein level for both receptors by immunoblot, in newborn sheep from lowland (n=5) and highland (n=6) and newborn llama from lowland (n=6) and highland (n=5). **Results:** at mRNA level, PPET-1, and ET_A and ET_B receptor expression increased in highland newborn sheep compared to the lowland group. On the other hand, the expression of these mRNA did not change when lowland and highland newborn llama were compared. The expression of the ET_A and ET_B receptors at protein level could not be determined because the antibodies assayed did not allow the specific detection of these receptors in the lungs from both species. **Conclusion:** the increase of pulmonary expression in the ET-1 system could be involved in the development of the pulmonary arterial hypertension observed in chronically hypoxic newborn sheep, whilst the ability to maintain without changes this system in the hypoxic newborn llama could contribute to prevent the development of the disease in this specie.

1. INTRODUCCIÓN

La transición desde la etapa fetal a la vida extrauterina es un proceso con profundos cambios que abarcan casi todos los aspectos del sistema cardiopulmonar. Este período se asocia con modificaciones circulatorias importantes al transferirse el intercambio gaseoso de la placenta a los pulmones, además de variar de un estado de alta resistencia vascular pulmonar *in utero* a un estado de baja resistencia en el momento del nacimiento.

Al nacer, la resistencia vascular pulmonar cae rápidamente con el inicio de la ventilación y el incremento en la tensión de oxígeno, el flujo sanguíneo pulmonar aumenta cerca de 10 veces, mientras que las comunicaciones fetales, como el *ductus arteriosus* y el *foramen ovale*, se cierran.

Algunos recién nacidos no logran una disminución adecuada de la resistencia vascular pulmonar, persistiendo una alta presión de la arteria pulmonar, lo que contribuye al desarrollo progresivo de anomalías estructurales y funcionales del lecho vascular pulmonar, síndrome conocido como Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN).

Varios modelos experimentales han sido estudiados para explorar la patogénesis y fisiopatología del síndrome de HPPRN. Algunos de estos modelos han incluido la exposición a hipoxia crónica *in utero* y después del nacimiento.

Siendo Chile un país montañoso, es cada vez mayor el número de personas que se exponen a la altura de sus montañas por períodos prolongados como mineros, militares, andinistas, turistas, transportistas y funcionarios públicos. Con el ascenso en la altitud, se produce una disminución de la presión barométrica, con la consecuente disminución en la presión parcial de oxígeno en el aire inspirado (hipoxia crónica de altura o hipoxia hipobárica), que se traduce en menor presión arterial de oxígeno (hipoxemia) y en una menor disponibilidad de oxígeno a los tejidos (hipoxia tisular).

El oxígeno es un importante modulador del tono vascular pulmonar. Al nacer en un ambiente hipóxico se producen cambios funcionales y estructurales en la vasculatura pulmonar, resultado de un desbalance en la producción de sustancias vasoactivas, lo que contribuye a una anormal adaptación a la vida postnatal y que incluso puede ser origen de enfermedades en la vida adulta.

La endotelina-1(ET-1) es un péptido producido por las células endoteliales con potentes propiedades vasoactivas y efecto mitogénico para la célula muscular lisa vascular. La ET-1 es sintetizada inicialmente a partir de un péptido precursor, la preproendotelina-1 (PPET-1) y procesada secuencialmente hasta producir ET-1. Los efectos de la ET-1, que incluyen vasoconstricción y/o vasodilatación pulmonar, son mediados por los receptores A (ET_A) y el B (ET_B), respectivamente.

El objetivo de este trabajo fue estudiar si existía un cambio en la expresión del mRNA de PPET-1, receptores ET_A y ET_B por medio de RT-PCR semicuantitativo y expresión proteica de ambos receptores por *immunoblot*, en pulmón de recién nacidos sometidos a hipoxia hipobárica crónica durante la gestación. Estos estudios de expresión se realizaron en recién nacidos gestados y nacidos a 580 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (tierras bajas) en comparación con recién nacidos gestados y nacidos a 3.600 m.s.n.m. (tierras altas), utilizando como modelo experimental a la oveja, especie que ha evolucionado en un ambiente cercano al nivel del mar o tierras bajas y la llama, especie que se adaptó a las condiciones ambientales existentes en la altura o tierras altas, el cual constituye hoy su ambiente natural.

Con estos antecedentes, la hipótesis planteada es que en pulmón de ovejas recién nacidas de tierras altas existe una mayor expresión de PPET-1 y del receptor ET_A y una menor expresión del receptor ET_B que en pulmón de ovejas recién nacidas de tierras bajas. Por otra parte, en pulmón de llamas recién nacidas no se presentarían cambios en la expresión de PPET-1 ni en ambos receptores, al comparar animales de tierras bajas y altas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CIRCULACIÓN PULMONAR EN ANIMALES ADULTOS

La mantención de la homeostasis del oxígeno es esencial para la sobrevivencia de todas las especies vertebradas. Para ello se han desarrollado sistemas fisiológicos que permiten asegurar la oxigenación óptima de las células en todos los organismos. La oxigenación tisular ocurre a través de la evolución de una compleja infraestructura anatómica que incluye la entrada (pulmón), transporte (eritrocitos), vías de conducción (vasculatura) y un sistema de bombeo (corazón). El establecimiento preciso de estos sistemas durante el desarrollo y su regulación en los organismos provee la base de la homeostasis del oxígeno (Michiels, 2004).

La función de la circulación sistémica es distribuir la sangre oxigenada a través de los distintos órganos, lo cual requiere una alta gradiente de presión sanguínea. Por otra parte, la principal función de la circulación pulmonar es mantener un intercambio gaseoso eficiente. Al compararla con la circulación sistémica, la circulación pulmonar en el adulto mantiene una baja presión vascular en forma constante, constituyendo un circuito en que todo el gasto cardíaco pasa a través del pulmón, con baja resistencia vascular que es capaz de acomodar grandes incrementos en el flujo, como ocurre en el ejercicio (Hampl y Herget, 2000; Guyton y Hall, 2001; Cline y Ambrosino, 2002).

Además, las arterias sistémicas y pulmonares son distintas estructuralmente, reflejando las diferentes funciones fisiológicas de estos sistemas circulatorios. La arteria pulmonar tiene una estructura predominantemente elástica con una pared delgada de un espesor equivalente a un tercio del espesor de la aorta. Además, todas las arterias pulmonares, incluso las arterias más pequeñas y las arteriolas, tienen diámetros mayores que las arterias sistémicas equivalentes. Estas características le

confieren al árbol arterial pulmonar una gran distensibilidad, que permite que las arterias pulmonares puedan acumular unos dos tercios del gasto sistólico del ventrículo derecho (Guyton y Hall, 2001; Clini y Ambrosino, 2002).

A nivel de los bronquiólos terminales, las arterias son predominantemente musculares, mientras que a nivel de los bronquiólos respiratorios las arterias son parcialmente musculares ó no musculares. Es esta la región más significativamente afectada en la hipertensión pulmonar (Clini y Ambrosino, 2002).

2.1.1. Vasoconstricción pulmonar hipóxica

La circulación pulmonar es única en exhibir una respuesta vasoconstrictora cuando es sometida a hipoxia aguda, actuando con un mecanismo que regula la relación entre ventilación y perfusión en esa zona, desviando sangre desde áreas pobremente ventiladas a aquellas ricas en oxígeno, optimizando así el intercambio gaseoso (Brij y Peacock, 1998; Hampl y Herget, 2000; Beall, 2001; Weissmann *et al.*, 2001; Clini y Ambrosino, 2002; Shimoda *et al.*, 2002). Esta es una respuesta rápida y reversible (Archer y Michelakis, 2002; Shimoda *et al.*, 2002), mientras que, por el contrario, el lecho vascular sistémico generalmente no responde a la hipoxia aguda o lo hace con vasodilatación (Hampl y Herget, 2000; Shimoda *et al.*, 2002).

Aunque la vasoconstricción pulmonar hipóxica fue descrita hace más de 60 años, su mecanismo no es completamente conocido (Hampl y Herget, 2000; Clini y Ambrosino, 2002; Shimoda *et al.*, 2002). Se encuentra virtualmente en todos los mamíferos, sin embargo, existen poblaciones humanas asentadas en el Tíbet (Beall, 2001; Archer y Michelakis, 2002) y especies animales como el yak (*Bos grunniens*) (Anand *et al.*, 1986; Durmowicz *et al.*, 1993; Archer y Michelakis, 2002), pika (*Ochotona sp*) (Ge *et al.*, 1998), marmota del Himalaya (*Marmota himalayana*) (Rhodes, 2005), blue-sheep (*Pseudois nayaur*) (Sakai *et al.*, 2003) y la llama (*Lama glama*) (Heath *et*

al., 1969; Heath *et al.*, 1974; Harris *et al.*, 1982; Rhodes, 2005), entre otros, todos ellos adaptados a la altura, en donde este mecanismo se encuentra atenuado.

En el periodo fetal, la vasoconstricción pulmonar hipóxica ayuda a desviar el escaso flujo sanguíneo que va al pulmón a través del *ductus arteriosus* hasta el resto del cuerpo. En el postparto, cuando los pulmones se llenan de aire, la vasculatura pulmonar se relaja permitiendo la perfusión de los vasos pulmonares (Weissmann *et al.*, 2001; Archer y Michelakis, 2002).

En adultos, una disminución de la presión parcial de oxígeno alveolar, tal como ocurre con el ascenso en la altura, causa un inmediato incremento en la resistencia vascular pulmonar y, por tanto, en la presión arterial pulmonar (Weissmann *et al.*, 2001; Archer y Michelakis, 2002; Shimoda *et al.*, 2002).

La respuesta vascular frente a hipoxia crónica generalizada, resulta en hipertensión pulmonar crónica, remodelación e hiperreactividad vascular pulmonar, falla cardíaca derecha y posiblemente muerte, como ocurre en la Enfermedad Crónica de Altura o Enfermedad de Monge (Brij y Peacock, 1998; Shimoda *et al.*, 2000; Weissmann *et al.*, 2001; Shimoda *et al.*, 2002).

La hipoxia crónica induce cambios fisiológicos en la vasculatura pulmonar, como un incremento en el tono vasomotor y reducción en el calibre vascular, el cual no sólo se debe a la remodelación estructural, sino a una activa vasoconstricción de la célula muscular lisa vascular. *In vivo*, la contracción de la célula muscular lisa vascular es influenciada por factores vasoconstrictores y vasodilatadores secretados por el endotelio, parénquima pulmonar o que provienen de la circulación (Shimoda *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2002). Durante hipoxia crónica, la producción de vasoconstrictores aumenta en el pulmón, mientras la síntesis de vasodilatadores estaría reducida, lo cual ha sido documentado en distintos modelos de hipertensión pulmonar hipóxica (McMurtry *et al.*, 1978; Porcelli y Bergman, 1983; Wanstall y O'Donnell, 1990; Eddahibi *et al.*, 1991; Rui y Cai, 1991; Eddahibi *et al.*, 1992; Carville *et*

al., 1993; MacLean *et al.*, 1995; Shimoda *et al.*, 2000). Además, la vasorreactividad alterada frente a agonistas vasoconstrictores y/o vasodilatadores es otra consecuencia fisiológica de la exposición crónica a hipoxia que, combinada con cambios en la síntesis de estos factores vasoactivos, contribuyen a la activa contracción de la célula muscular lisa, resultando en el incremento de la resistencia vascular pulmonar y elevación de la presión arterial pulmonar (Shimoda *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2002).

La hipoxia crónica también puede tener otros efectos sobre la célula muscular lisa vascular, modulando la población de receptores, actividad de canales iónicos o vías de transducción de señales (Shimoda *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2002).

Se han realizado considerables esfuerzos para identificar las células responsables de detectar el oxígeno, el mecanismo de detección y las vías de transducción de señales que llevan a la contracción del músculo liso vascular en los vasos de resistencia precapilares, los cuales serían el sitio predominante de vasoconstricción pulmonar hipóxica (Weissmann *et al.*, 2001; Archer y Michelakis, 2002; Clini y Ambrosino, 2002). Si bien se ha avanzado en este tema, estas preguntas no están totalmente resueltas.

2.2. CIRCULACIÓN CARDIOPULMONAR EN FETOS

En el feto, el intercambio gaseoso ocurre en la placenta y no en los pulmones (Teitel y Heymann, 1988; Heymann, 1999; Hampl y Herget, 2000). Para que la sangre oxigenada de la placenta alcance a la circulación sistémica (y también para que la sangre no oxigenada se dirija del cuerpo a la placenta para ser oxigenada) la circulación fetal presenta varias comunicaciones, tales como el *ductus arteriosus*, *foramen ovale* y *ductus venosus*. Además se produce una circulación preferencial del retorno venoso en la vena cava inferior, para contrarrestar parcialmente las desventajas de la mezcla de sangre oxigenada con sangre no oxigenada, dirigiéndose

la sangre más oxigenada al hemicuerpo superior (corazón y sistema nervioso central) (Teitel y Heymann, 1988).

Debido a la presencia del *ductus arteriosus* y del *foramen ovale*, la circulación fetal se considera como dos circulaciones en paralelo (Teitel y Heymann, 1988; Kiserud y Acharya, 2004) y el gasto cardíaco fetal se expresa como el gasto total del corazón o la combinación de los gastos de los ventrículos derecho e izquierdo. En los fetos ovinos esto representa alrededor de 400-450 mL/kg/min al final de la gestación (Teitel y Heymann, 1988).

El 57 % del gasto ventricular derecho atraviesa el *ductus arteriosus* e ingresa a la aorta descendente. Sólo una pequeña fracción de este gasto, entre 5-7 % al 75 % de gestación, fluye a través de las arterias pulmonares hacia los pulmones (Teitel y Heymann, 1988; Abman, 1999; Heymann, 1999; Hampl y Herget, 2000; Suguihara, 2001; Kiserud y Acharya, 2004).

La presión de la arteria pulmonar y el flujo sanguíneo pulmonar aumentan progresivamente con el avance de la edad gestacional (Abman, 1999; Suguihara, 2001). Sin embargo, el flujo sanguíneo pulmonar es bajo, corresponde a un 8-10 % del gasto cardíaco total en fetos ovinos al final de la gestación (Teitel y Heymann, 1988; Abman, 1999; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001) y entre 13-25 % en fetos humanos (Kiserud y Acharya, 2004). Esta sangre que llega al pulmón aporta nutrientes y estimula el crecimiento pulmonar, mientras se optimiza el flujo sanguíneo hacia otros tejidos fetales y la placenta (Ghanayem y Gordon, 2001).

La resistencia vascular pulmonar al comienzo de la gestación es extremadamente alta si se compara con un recién nacido o con un adulto, probablemente debido al reducido número de arterias pulmonares. Durante la segunda mitad de la gestación, se desarrollan nuevas arterias, el área de sección transversal aumenta y la resistencia vascular pulmonar cae progresivamente. Sin embargo, la resistencia vascular pulmonar basal continúa siendo mucho mayor que aquella observada después del nacimiento (Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001; Suguihara, 2001). En este aspecto, la

circulación pulmonar fetal se asemeja más bien a las características del lecho vascular pulmonar de un adulto con hipertensión arterial pulmonar (Hampl y Herget, 2000).

Los mecanismos que contribuyen en mantener alta la resistencia vascular pulmonar no son totalmente conocidos, sin embargo, podrían incluir factores tales como ausencia de una interfase aire-líquido en los pulmones, baja PaO₂ (presión parcial de oxígeno arterial), una menor producción basal o actividad de sustancias vasodilatadoras versus una mayor producción basal o actividad de sustancias vasoconstrictoras y un mayor tono miogénico (Abman, 1999; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001; Suguihara, 2001).

2.2.1. Rol del endotelio vascular pulmonar fetal

Antes de 1980, el endotelio era considerado como una barrera hemostática y la adventicia simplemente como estructura de soporte para el vaso, e incluso los estudios que investigaban la regulación del tono vasomotor se localizaban casi exclusivamente en la célula muscular lisa de la túnica media. Sin embargo, hoy se sabe que el endotelio es un tejido activo, que se localiza en una posición estratégica dentro de la pared vascular, siendo directamente expuesto a fuerzas mecánicas ejercidas por la sangre y a sustancias vasoactivas (Hürliemann *et al.*, 2002). Posee un rol autocrino, paracrino y endocrino, suministrando mecanismos eficientes de control vasomotor en el sistema circulatorio (Clini y Ambrosino, 2002).

La principal función del endotelio vascular pulmonar en el período perinatal es regular el tono vascular pulmonar, evacuar el fluido alveolar y asegurar la integridad de la barrera endotelial (Wojciak-Stothard y Haworth, 2006).

Los principales productos derivados del endotelio vascular en el pulmón fetal incluyen sustancias predominantemente vasoconstrictoras, tales como leucotrienos C₄ y D₄, tromboxano A₂ y ET-1, sobre las vasodilatadoras como prostaciclina, monóxido de carbono y óxido nítrico, generando así un tono contráctil aumentado (Abman, 1999; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001; Suguihara, 2001).

Estos productos endoteliales pueden contribuir no solo con la mantención del tono vascular basal en el pulmón fetal, sino que también pueden modular la respuesta frente a estímulos, tales como hipoxia, aumento de la presión arterial pulmonar y estrés tangencial (Hürlimann *et al.*, 2002; Wojciak-Stothard y Haworth, 2006).

La vasculatura pulmonar fetal puede responder tempranamente durante la gestación a la acción de factores vasoactivos liberados, pero esta reactividad vascular aumenta aún más al final de la gestación. Por ejemplo, la vasoconstricción pulmonar como respuesta a la hipoxia y la respuesta vasodilatadora por incremento de la PaO₂, aumentan con el avance de la gestación en el feto ovino. Esto sugiere que, además de una maduración estructural de la circulación pulmonar, los vasos sanguíneos también sufren una maduración funcional, lo que lleva a un aumento de la vasoreactividad a medida que avanza la vida fetal (Abman, 1999).

2.3. ADAPTACIÓN DE LA CIRCULACIÓN CARDIOPULMONAR DURANTE LA TRANSICIÓN DE FETO A RECIÉN NACIDO

La transición de la circulación fetal a la neonatal se asocia con modificaciones circulatorias importantes, al transferirse el intercambio de gas de la placenta a los pulmones. El flujo sanguíneo pulmonar se eleva rápidamente, el flujo sanguíneo umbilico-placentario desaparece y las comunicaciones fetales no continúan siendo necesarias, por lo tanto, comienzan a cerrarse. Rápidamente después del nacimiento se produce un aumento importante del gasto cardíaco. Con el comienzo de la ventilación pulmonar y el aumento del flujo sanguíneo a los pulmones, desaparece la diferencia entre el gasto cardíaco del ventrículo derecho y el del ventrículo izquierdo. Así, los gastos ventriculares izquierdo y derecho se igualan y entonces las circulaciones pulmonar y sistémica funcionan ahora en serie y no en paralelo (Teitel y Heymann, 1988; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001).

En las ovejas recién nacidas el gasto ventricular derecho (ahora el flujo sanguíneo pulmonar) se eleva de aproximadamente 300 mL/kg/min en el feto a término hasta 350 mL/kg/min. Además, el gasto ventricular izquierdo (flujo sanguíneo sistémico) se eleva significativamente de alrededor de 150 mL/kg/min en el feto a término hasta aproximadamente 350 mL/kg/min poco tiempo después del nacimiento. Hacia la sexta semana de vida el gasto cardíaco disminuye progresivamente hasta alcanzar aproximadamente 150 mL/kg/min. Siguiendo al gasto cardíaco, el consumo de oxígeno se eleva del nivel fetal de alrededor de 8 mL/kg/min hasta aproximadamente 15 mL/kg/min en el recién nacido y luego desciende en la sexta semana de vida a valores cercanos a 10 mL/kg/min (Teitel y Heymann, 1988).

Una de las principales adaptaciones del recién nacido a las condiciones de vida postnatal, es el cambio de la circulación pulmonar fetal desde un estado de alta resistencia vascular pulmonar *in utero*, a un estado de baja resistencia vascular pulmonar después del nacimiento (Abman, 1999). Esta caída en la resistencia vascular pulmonar permite el aumento cerca de 10 veces del flujo sanguíneo pulmonar, permitiendo así a los pulmones asumir su función metabólica y de intercambio gaseoso extrauterino. Los mecanismos que contribuyen a la caída normal de la resistencia vascular pulmonar al nacer, incluyen el establecimiento de una interfase aire-líquido en el pulmón, aumento de la PaO₂, distensión rítmica de los pulmones, estrés tangencial, liberación de sustancias vasoactivas y remodelación de la pared vascular (Abman *et al.*, 1989; Abman, 1999; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001; Perreault, 2006).

Se ha visto que la iniciación de la distensión rítmica de los pulmones causa vasodilatación, incluso en ausencia de un incremento de la PaO₂. Esto es debido en parte a la distensión mecánica de los pulmones, lo que aumenta el diámetro de los vasos, que es un determinante físico de la resistencia vascular pulmonar. Además, la deformación mecánica de los pulmones puede aumentar directamente la síntesis de moduladores vasodilatadores. El aumento en la PaO₂ también reduce la resistencia vascular pulmonar, incluso en ausencia de ventilación (Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001).

El tono vascular pulmonar, modulado por la producción de sustancias vasoactivas, se reduce por aumento en la producción de moduladores vasodilatadores por sobre los vasoconstrictores (Abman *et al.*, 1989; Abman, 1999; Heymann, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001). Junto a esta respuesta vasodilatadora, el aumento del flujo sanguíneo pulmonar distiende los pulmones, causando una reorganización estructural de la pared vascular (Abman, 1999), donde los cambios más dramáticos tienen lugar en los vasos precapilares. En menos de 5 minutos después del nacimiento, las células endoteliales disminuyen su grosor aumentando así el lumen vascular. La remodelación postnatal endotelial es considerada actualmente un proceso activo, probablemente gatillado por un incremento en la PaO₂ que conduce a remodelación del citoesqueleto y a cambios en la composición y actividad de las células endoteliales (Wojciak-Stothard y Haworth, 2006). Así, la habilidad de adaptarse a este gran aumento del flujo sanguíneo pulmonar requiere un cambio estructural y funcional para asegurar la normal caída de la resistencia vascular pulmonar postnatal (Abman, 1999).

2.3.1. Falla en la adaptación de la circulación pulmonar durante el periodo de transición e Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido

Algunos recién nacidos fallan en la disminución normal de la resistencia vascular pulmonar al nacer, lo cual conduce a una severa disfunción respiratoria e hipoxemia, originándose un síndrome conocido como Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN) (Abman, 1999; Ghanayem y Gordon, 2001; Suguihara, 2001; Wojciak-Stothard y Haworth, 2006). Este síndrome tiene una incidencia estimada de 1,9 por cada 1.000 nacidos vivos, en humanos (Suguihara, 2001; Galié *et al.*, 2004; Wojciak-Stothard y Haworth, 2006) y puede ser idiopático o complicado por una variedad de enfermedades cardiopulmonares neonatales (Abman, 1999; Suguihara, 2001; Galié *et al.*, 2004; Perreault, 2006; Wojciak-Stothard y Haworth, 2006).

A pesar de las diferencias que existen en el origen de este síndrome, se mantienen características fisiopatológicas comunes como la alta resistencia vascular pulmonar, hipertensión pulmonar y comunicación intrapulmonar y extrapulmonar de derecha a izquierda a través del *ductus arteriosus* o *foramen ovale* que contribuyen aún más al

desarrollo de hipoxemia (Abman *et al.*, 1989; Abman, 1999; Suguihara, 2001; Galié *et al.*, 2004). A pesar de los últimos avances en medicina perinatal, la HPPRN continúa siendo un importante problema clínico que contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad de los recién nacidos (Abman *et al.*, 1989; Abman, 1999; Suguihara, 2001).

Los mecanismos que pueden contribuir con una severa hipertensión pulmonar después del nacimiento no son completamente conocidos, pero pueden incluir anomalías del tono, reactividad, crecimiento y estructura de la vasculatura pulmonar. Debido a que la HPPRN representa una falla de la adaptación de la circulación pulmonar al momento del nacimiento, el entendimiento de los mecanismos básicos que permiten un desarrollo estructural y funcional normal de la circulación pulmonar *in utero* y los mecanismos que contribuyen a la vasodilatación pulmonar en el momento del nacimiento, pueden proveer una guía para el tratamiento exitoso de esta enfermedad (Abman, 1999; Suguihara, 2001).

Información proveniente de estudios en animales sugiere que la hipertensión fetal crónica y/o hipoxia crónica podrían causar lesiones estructurales similares a aquellas encontradas en humanos con esta enfermedad (Abman *et al.*, 1989; Abman, 1999).

Por ejemplo, la hipertensión pulmonar inducida por el cierre del *ductus arteriosus* en fetos ovinos altera la reactividad vascular y estructura pulmonar, causando falla en la adaptación postnatal, proporcionando un modelo experimental de estudio de esta enfermedad. En este modelo, el cierre parcial del *ductus arteriosus* aumenta la presión y la resistencia vascular pulmonar. Luego del parto, estas ovejas recién nacidas mantienen elevada la resistencia vascular pulmonar a pesar del inicio de la ventilación mecánica con altas concentraciones de oxígeno (Abman, 1999).

2.4. SISTEMA DE ENDOTELINAS

La ET-1 ha sido definida como la más potente sustancia endógena vasoconstrictora de acción prolongada descubierta hasta hoy (Galié *et al.*, 2004). Esta sustancia, aislada a partir de células endoteliales pulmonares y sistémicas a mediados de los años 80', fue caracterizada en 1988 como un péptido de 21 aminoácidos (Yanagisawa *et al.*, 1988). Desde que el sistema de las endotelinas fue descubierto, ha sido involucrado en múltiples funciones fisiológicas relacionadas con el sistema nervioso, renal, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y endocrino. También se ha visto implicado en algunas patologías como carcinogénesis, broncoconstricción, fibrosis, falla cardíaca e hipertensión pulmonar (Masaki *et al.*, 1999; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

El sistema de las endotelinas está formado por los 3 genes de endotelina, 3 prepropéptidos, dos peptidasas activantes, tres isoformas del péptido: ET-1, endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3) y los receptores ET_A y ET_B ambos acoplados a proteína G (Masaki *et al.*, 1999; Galié *et al.*, 2004). Los receptores de endotelina se ubican en la membrana plasmática de diferentes células (Masaki *et al.*, 1999; Galié *et al.*, 2004), sin embargo, se ha demostrado la presencia de ambos receptores en el citosol y, además, del receptor ET_B en el nucleoplasma y membrana nuclear de cardiomiocitos, célula muscular lisa vascular y hepatocitos (Bkaily *et al.*, 2006).

Las 3 endotelinas son producidas a partir de una variedad de células en diferentes proporciones. Las células endoteliales vasculares producen exclusivamente ET-1 (Rubanyi y Botelho, 1991; Masaki *et al.*, 1999), sin embargo, también es sintetizada en leucocitos, macrófagos, células musculares lisas, cardiomiocitos, células epiteliales de las vías aéreas y células mesangiales (Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

La ET-1 es el miembro de la familia de endotelinas mejor caracterizado y estudiado (Ivy *et al.*, 2000a; Kedzierski y Yanagisawa, 2001).

Las células endoteliales liberan menos del 25 % de ET-1 al lumen vascular, lo que sugiere un rol paracrino/autocrino principalmente (Rubanyi y Botelho, 1991; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

La ET-1 es inicialmente sintetizada como un prepropéptido, la PPET-1 de 203 aminoácidos, que luego es procesada por una endopeptidasa (furin convertasa) a Bigendotelina-1 (BigET-1). La BigET-1, un péptido de 38 aminoácidos, es convertida a ET-1 principalmente por acción de la enzima convertidora de endotelina-1 (ECE-1). Esta enzima es una metaloproteasa unida a membrana presente en la célula endotelial y muscular lisa vascular (Masaki *et al.*, 1999; Ivy *et al.*, 2000a; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

Las otras isoformas de la endotelina son también sintetizadas de la misma manera a partir de sus propios precursores: preproendotelina 2 (PPET-2) y 3 (PPET-3) y BigET 2 (BigET-2) y 3 (BigET-3) (Masaki *et al.*, 1999; Kedzierski y Yanagisawa, 2001).

Estímulos como hipoxia, isquemia y estrés tangencial, entre otros, modulan la transcripción del gen de la PPET-1 (Masaki *et al.*, 1999; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

El procesamiento de ET-1 ocurre intracelularmente en vesículas secretorias constitutivas (Masaki *et al.*, 1999; Russell y Davenport, 1999), sin embargo, la regulación de la cantidad de ET-1 tiene lugar principalmente a nivel de la síntesis. Frente a estímulos específicos, dentro de algunos minutos, aumenta la transcripción del gen de PPET-1, los niveles del mRNA de PPET-1 y la síntesis y secreción de ET-1. (Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004). La vida media del mRNA es aproximadamente 15-20 minutos y la vida media en plasma de ET-1 es cercana a los 4-7 minutos, por lo tanto, las células vasculares pueden ajustar rápidamente la producción de ET-1 para regular el tono vasomotor (Galié *et al.*, 2004).

Los receptores ET_A y ET_B se encuentran en la célula muscular lisa vascular mediando vasoconstricción, además, el receptor ET_B se localiza en la célula endotelial

mediando

vasodilatación

(M

asaki *et al.*, 1999; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

La unión de ET-1 a ambos receptores en la célula muscular lisa regula la actividad de adenilil ciclasa, de fosfolipasa C y de canales iónicos, lo que produce vasoconstricción prolongada. La activación de fosfolipasa C provoca un aumento del inositol trifosfato, diacilglicerol y del calcio intracelular (Ca^{2+}). El inositol trifosfato, al unirse a su receptor en el retículo sarcoplásmico, estimula la liberación de Ca^{2+} almacenado en el interior. El aumento del diacilglicerol y del Ca^{2+} estimulan a la proteína quinasa C, la cual media la acción mitogénica de la ET-1, estimulando la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Masaki *et al.*, 1999; Galié *et al.*, 2004). La ET-1 y el receptor ET_A , juegan un importante rol en la mantención del tono vasomotor basal y presión sanguínea (Masaki *et al.*, 1999; Galié *et al.*, 2004). Por otro lado, la activación del receptor ET_B endotelial estimula la liberación de óxido nítrico y prostaciclina, previene la apoptosis, inhibe la expresión de ECE-1 en la célula endotelial y juega un importante rol en la vasodilatación (Galié *et al.*, 2004). Además los receptores ET_B median el *clearance* de ET-1 circulante en pulmón (Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004) y riñones (Rubanyi y Botelho, 1991; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

2.4.1. Sistema de endotelinas y circulación pulmonar

Los pulmones representan el principal órgano diana para los efectos de la ET-1 y un especial sitio para su metabolización (Galié *et al.*, 2004). La ET-1 es expresada por las células endoteliales, células epiteliales de las vías aéreas y macrófagos. Los receptores se encuentran ampliamente distribuidos en todos los compartimientos incluyendo vasos, bronquios y alvéolos. La proporción en que se distribuyen ambos receptores en las vías aéreas es especie-dependiente. En bronquios de humanos, el receptor ET_B es 10 veces más abundante que el receptor ET_A , mientras ocurre lo contrario en los bronquios de oveja (Kedzierski y Yanagisawa, 2001).

Los pulmones son el principal sitio de producción y *clearance* de ET-1 circulante; remueven entre el 50-80 % de la ET-1 por medio del receptor ET_B y liberan una cantidad similar a circulación (Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

Cuando ET-1 es administrada en forma endovenosa, se produce una respuesta bifásica en la circulación pulmonar, con vasodilatación inicial, seguida de una vasoconstricción sostenida. La vasodilatación inicial se debe a la unión de ET-1 al receptor ET_B endotelial produciendo liberación de óxido nítrico y prostaciclina. La vasoconstricción vascular es mediada por ambos receptores ET_A y ET_B en la célula muscular lisa vascular, por lo tanto, se requiere de la inhibición de ambos receptores para frenar la vasoconstricción inducida por ET-1 (Rubanyi y Botelho, 1991; Kedzierski y Yanagisawa, 2001; Galié *et al.*, 2004).

2.4.2. Rol de la ET-1 en Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido

La HPPRN podría ser explicada no solo por una menor producción de vasodilatadores pulmonares, sino también por un incremento en la producción de vasoconstrictores tales como ET-1 (Suguihara, 2001). Varios estudios han revelado que los pacientes con esta enfermedad presentan elevados niveles plasmáticos de ET-1, que incluso se correlaciona positivamente con la severidad de esta enfermedad (Suguihara, 2001; Galié *et al.*, 2004), demostrándose incluso que los niveles plasmáticos de ET-1 disminuyen durante la recuperación (Suguihara, 2001). En modelos experimentales de HPPRN inducida por hipoxia, los niveles de ET-1 circulantes están elevados (Wojciak-Stothard y Haworth, 2006).

2.5. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA EN EL PERÍODO PERINATAL

La transición cardiopulmonar perinatal en grandes altitudes, a más de 3.000 m.s.n.m., difiere de la observada en tierras bajas o a nivel del mar, debido a que el oxígeno juega un rol fundamental en el desarrollo de los cambios cardiopulmonares

desde feto a recién nacido (Niermeyer, 2003). Al nivel del mar, la presión de la arteria pulmonar cae rápidamente después del nacimiento. En altura, la presión arterial pulmonar permanece elevada durante el período neonatal (Niermeyer, 2003).

El modelo de hipoxia fetal y neonatal en grandes altitudes ofrece un gran potencial para el entendimiento de los mecanismos que contribuyen a la génesis de la hipertensión pulmonar a nivel celular y molecular (Niermeyer, 2003).

Nacer en un ambiente hipóxico crónico resulta en variadas alteraciones en la ventilación y función pulmonar. Esto incluye alteraciones en el control respiratorio, extracción de oxígeno, función y estructura pulmonar. Aunque la presión barométrica cae casi linealmente con el aumento en la altitud, la saturación de oxígeno no depende sólo de la presión de oxígeno inspirado, sino de una serie de variables fisiológicas, que incluyen ventilación alveolar, cambio en la afinidad de hemoglobina por el oxígeno y reactividad del lecho vascular pulmonar (Beall, 2001; Niermeyer, 2003).

Un aumento moderado y transitorio en la presión arterial pulmonar puede ser adaptativo, modulando la ventilación y perfusión pulmonar, sin embargo, su persistencia por períodos prolongados puede convertirse en un estado patológico produciendo, por ejemplo, edema de altura en humanos, enfermedad de *brisket* en bovinos e HPPRN, entre otras enfermedades (Abman, 1999; Maggiorini y León-Velarde, 2003; Rhodes, 2005). Además, se sabe que en la mayoría de las especies el árbol arterial pulmonar responde frente a un estímulo hipóxico con vasoconstricción (Hampel y Herget, 2000; Beall, 2001; Weissmann *et al.*, 2001; Clini y Ambrosino, 2002; Shimoda *et al.*, 2002). Esto conduce a engrosamiento de la capa muscular de las porciones terminales del árbol arterial pulmonar, una elevada resistencia vascular pulmonar y consecuentemente hipertrofia ventricular derecha. El incremento de la resistencia vascular pulmonar se asocia con hipertrofia de pequeñas arterias pulmonares, en diversas especies animales (Heath *et al.*, 1969; Heath *et al.*, 1974; Harris *et al.*, 1982; Nakanishi *et al.*, 1999).

Algunas especies pueden tolerar prolongados periodos de escasez de oxígeno, tal como ocurre con los camélidos sudamericanos que representan un modelo de adaptación a las condiciones ambientales existentes en las grandes altitudes, su ambiente natural (Raggi y Ferrando, 1998). La llama (*Lama glama*), especie perteneciente a los camélidos sudamericanos, que ha vivido en altura al menos por 2 millones de años (Stanley *et al.*, 1994), puede tolerar prolongados periodos de baja PO₂ atmosférica. Se cree que la exposición a una baja PO₂ atmosférica (hipoxia hipobárica o hipoxia crónica de altura) en el *altiplano* Andino ha permitido a esta especie seleccionar genes que expresan eficientes mecanismos para resistir la hipoxia crónica, persistiendo en llamas gestadas y nacidas a nivel del mar (Llanos *et al.*, 2003).

Estas adaptaciones fisiológicas incluyen una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (baja P₅₀), glóbulos rojos pequeños y en elevado número, lo que determina una mayor superficie de contacto y de forma elíptica lo que facilita el movimiento hacia capilares más pequeños. Otras adaptaciones son una alta concentración de hemoglobina sanguínea y de mioglobina muscular, lo que facilita el suministro de oxígeno a nivel tisular (Bartels *et al.*, 1963; Raggi y Ferrando, 1998; Llanos *et al.*, 2003). Además, las llamas adultas mantienen una baja presión arterial pulmonar con ausencia de muscularización de las arteriolas pulmonares, a pesar de vivir en grandes altitudes. Estas características anatómicas y fisiológicas en los vasos pulmonares permiten a las llamas tolerar la hipoxia crónica, a diferencia de los animales de tierras bajas (Llanos *et al.*, 2003).

La llama no muestra hipertrofia del ventrículo derecho ni de la capa media del tronco pulmonar o de las pequeñas arterias pulmonares, lo que sugiere que la llama no presentaría hipertensión pulmonar sostenida y significativa (Raggi y Ferrando, 1998). Sin embargo, en un estudio en camélidos adultos, se determinó que la presión arterial pulmonar media es leve pero significativamente mayor en animales gestados y nacidos en altura que a nivel del mar (Harris *et al.*, 1982).

Por el contrario, especies adaptadas a vivir en tierras bajas como el humano (*Homo sapiens*) o la oveja (*Ovis aries*), que fue introducida en el *altiplano* Andino hace

aproximadamente 500 años, tienen menor capacidad de tolerar la hipoxia crónica, presentando hipertensión arterial pulmonar con la exposición a la altura (Peñaloza *et al.*, 1963; Sime *et al.*, 1963; Herrera *et al.*, 2007a).

Además, se ha visto que en ovejas gestadas en tierras altas hay restricción del crecimiento intrauterino, menor peso al nacer, independientemente del tiempo de residencia de la oveja en este ambiente hipóxico (Parraguez *et al.*, 2005), sin embargo, la oveja de tierras altas presenta cambios morfológicos que mejoran el intercambio gaseoso de la placenta, aboliendo al menos en parte, los efectos de una menor presión parcial de oxígeno atmosférico (Parraguez *et al.*, 2006).

Al comparar la presión arterial pulmonar de ovejas y llamas recién nacidas gestadas y nacidas en tierras altas a 3.600 m.s.n.m. con el valor observado en ambas especies en recién nacidos gestados y nacidos en tierras bajas a 580 m.s.n.m, se constató que las ovejas recién nacidas presentan hipertensión arterial pulmonar en la altura, mientras la presión arterial pulmonar no varió significativamente entre las llamas de tierras bajas y altas (Herrera *et al.*, 2004a; Herrera *et al.*, 2004b; Herrera *et al.*, 2007a; Herrera *et al.*, 2007b). Además, la resistencia vascular pulmonar presenta el mismo patrón (Herrera *et al.*, 2007a).

Adicionalmente, en estudios *ex vivo* en arterias pulmonares de resistencia aisladas de ovejas recién nacidas, se ha observado que existe una mayor respuesta contráctil a KCl en animales de tierras altas que en animales de tierras bajas, sugiriendo la presencia de mayor masa muscular vascular, lo que concuerda con un mayor tono basal pulmonar en los animales sometidos a hipoxia crónica (Herrera *et al.*, 2004a; Herrera *et al.*, 2007a; Herrera *et al.*, 2007b).

En conclusión, a pesar de las diferentes condiciones ambientales, las llamas recién nacidas de tierras bajas y las llamas recién nacidas de tierras altas poseen valores similares en la presión arterial pulmonar y resistencia vascular pulmonar. Por otro lado, las ovejas recién nacidas de tierras altas presentan una mayor presión arterial pulmonar, resistencia vascular pulmonar y respuesta contráctil en arterias pulmonares

que las ovejas recién nacidas de tierras bajas, lo que es compatible con una mayor masa muscular producto de la hipertensión pulmonar por efecto de la hipoxia crónica en el *altiplano* Andino.

2.6. ROL DEL SISTEMA DE ENDOTELINAS EN HIPERTENSIÓN PULMONAR HIPÓXICA CRÓNICA

Se sabe que la ET-1 juega un rol significativo en el desarrollo de vasoconstricción durante hipertensión pulmonar hipóxica, ya que los niveles de ET-1 circulante aumentan durante hipoxia prolongada en animales adultos y en humanos con enfermedad pulmonar crónica, en donde, el aumento en los niveles de ET-1 circulante se correlaciona directamente con el incremento en la presión arterial pulmonar (Li *et al.*, 1994; Semenza, 2000; Ao *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2002).

Otros estudios demuestran que los niveles plasmáticos de ET-1 aumentan con la altitud, que estos niveles varían inversamente con las saturaciones de oxígeno arterial y que son directamente proporcionales con el aumento de la presión arterial pulmonar con la altura (Goerre *et al.*, 1995; Morganti *et al.*, 1995; Beall, 2001).

El mecanismo por el cual los niveles de ET-1 se elevan en respuesta a hipoxia no es completamente comprendido, sin embargo, el gen de PPET-1 contiene en su promotor un sitio de unión para el Factor Inducible por Hipoxia-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*, HIF-1) (Semenza, 2000; Ao *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2002; Semenza, 2004).

El HIF-1 es un factor de transcripción que existe como un heterodímero compuesto de las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . La subunidad HIF-1 β se encuentra ampliamente expresada en tejidos de mamíferos bajo condiciones de normoxia, mientras que la subunidad HIF-1 α es virtualmente indetectable bajo estas condiciones, ya que es rápidamente degradada en presencia de oxígeno, pero esta degradación es inhibida y

sus niveles aumentan a medida que la tensión de oxígeno disminuye. HIF-1 α contiene un dominio de degradación dependiente de oxígeno con residuos de prolina que se hidroxilan específicamente bajo condiciones de normoxia, lo que favorece su unión a la proteína von Hippel-Lindau. Esta asociación permite la ubiquitinización de HIF-1 α para ser degradado en un proteosoma. Cuando los niveles de oxígeno descienden, la hidroxilación se inhibe y el HIF-1 α no es degradado, permitiendo la formación del complejo HIF-1 estable. Cuando el HIF-1 es translocado al núcleo comienza la transcripción de aquellos genes que portan en su región promotora una secuencia de unión específica para HIF-1, el Elemento de Respuesta a Hipoxia (*Hypoxia Response Element (HRE)*) (Shimoda *et al.*, 2002; Michiels, 2004; Schofield y Ratcliffe, 2004; Semenza, 2005).

Por lo tanto, el HIF-1 sería un importante regulador de la transcripción del mRNA de PPET-1 frente a un estímulo hipóxico en el endotelio vascular sistémico (Hu *et al.*, 1998) y pulmonar (Semenza, 2000; Ao *et al.*, 2002; Semenza, 2004).

Por otra parte, en experimentos con ovejas se determinó que el receptor ET_B, que media vasodilatación, se encuentra sólo en el endotelio de pulmón fetal y su bloqueo con antagonistas específicos causa hipertensión pulmonar (Ivy *et al.*, 1994; Ivy *et al.*, 2000a; Ivy *et al.*, 2000b). Por ejemplo, el bloqueo del receptor ET_B con el antagonista BQ-788 por 7 días en fetos ovinos, produjo un aumento de la presión y resistencia arterial pulmonar, anormal reactividad vascular, hipertrofia del ventrículo derecho, cambios estructurales pulmonares hipertensivos y aumento del contenido proteico de ET-1 (Ivy *et al.*, 2000b). Por otro lado, el bloqueo del receptor ET_A con distintos antagonistas produce vasodilatación pulmonar en fetos ovinos y ovejas recién nacidas en distintos modelos de hipertensión pulmonar (Ivy *et al.*, 1996a; Ivy *et al.*, 1996b; Ivy *et al.*, 1997; Coe *et al.*, 2002; Fratz *et al.*, 2004).

En un modelo experimental de hipertensión pulmonar crónica intrauterina por ligadura del *ductus arteriosus* en fetos ovinos, aumentó la expresión del mRNA de PPET-1 en un 71 %, mientras que disminuyó la expresión génica del receptor ET_B en un 62 %. La expresión del mRNA para el receptor ET_A y ECE-1 no cambiaron en este

modelo de hipertensión pulmonar, sin embargo, la expresión proteica y la actividad de la enzima no fueron estudiadas (Ivy *et al.*, 1998).

Otro estudio que utilizó como modelo la hipertensión pulmonar secundaria a un incremento del flujo sanguíneo pulmonar, en ovejas recién nacidas de 4 semanas de edad, aumentó la expresión del mRNA y de la proteína para el receptor ET_A y de ECE-1, y disminuyó la del receptor ET_B (Black *et al.*, 2000).

Todas estas alteraciones en la expresión génica pueden contribuir al desarrollo de hipertensión pulmonar y asociarse con el aumento en la reactividad vascular pulmonar a futuro (Black *et al.*, 2000).

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, en esta Memoria de Título se investigó la expresión de la PPET-1, como precursor de ET-1 y de los receptores ET_A y ET_B, en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas de tierras bajas y altas, y se determinó si existe un cambio en la expresión de éstos como consecuencia de la exposición a la hipoxia crónica de altura en estos modelos experimentales.

3. HIPÓTESIS

En pulmón de ovejas recién nacidas de tierras altas existe una mayor expresión de PPET-1 y del receptor ET_A y una menor expresión del receptor ET_B que en recién nacidas de tierras bajas. Contrariamente, las llamas recién nacidas no presentan cambios en la expresión de PPET-1 y ambos receptores al comparar animales de tierras bajas y altas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de PPET-1 y de los receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas de tierras bajas y altas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la expresión del mRNA de PPET-1 y de los receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas de tierras bajas y altas.
2. Evaluar la expresión de los receptores ET_A y ET_B a nivel proteico en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas de tierras bajas y altas.
3. Comparar la expresión de PPET-1 y de los receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas de tierras bajas y altas y entre llamas recién nacidas de tierras bajas y altas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue realizado en los Laboratorios de Fisiología y Fisiopatología del Desarrollo, y de Bioquímica y Biología Molecular de la Hipoxia, Programa de Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre la Investigación en los Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y siguen las recomendaciones de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Guiding Principles for Research Involving Animals and Human being of the American Physiological Society* (<http://newton.nap.edu/html/labrats>) y de *Guidance on the Operation of the Animals (Scientific Procedure)* (<http://www.archive.official-documents.co.uk/document/hoc/321/321.htm>).

6.1. MODELO EXPERIMENTAL

Fueron utilizadas 5 ovejas recién nacidas y 6 llamas recién nacidas gestadas y nacidas en tierras bajas (Santiago, 580 m.s.n.m.) y 6 ovejas recién nacidas y 5 llamas recién nacidas gestadas y nacidas en tierras altas (Putre, 3.600 m.s.n.m), con una edad que fluctuó entre 5 y 15 días.

Las ovejas y llamas de tierras altas fueron mantenidas en la Estación Experimental Putre del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), Universidad de Chile, Putre, Región Arica-Parinacota, en corrales colectivos abiertos. Los animales se alimentaron con heno de alfalfa (2 kg/animal/día) y bebieron agua *ad libitum*. Se realizaron manejos generales como desparasitación con Ivermectina (IvomecF®, Merial, 1 mL/50 kg, vía subcutánea) tres veces al año, vacunación contra *Clostridium* (Clostribac-8®, Pfizer, 2,5 mL/oveja y 5 mL/llama, vía intramuscular) una vez al año y esquila una vez al año.

Las ovejas y llamas de tierras bajas fueron mantenidas en idénticas condiciones de alimentación y manejo en la Estación Experimental Rinconada de la Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, Santiago, Región Metropolitana.

6.2. PROTOCOLO DE DISECCIÓN Y OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Los recién nacidos fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis anestésica de Tiopental sódico (Tiopental L.CH., 100 mg/kg) seguida de una inyección de cloruro de potasio (KCl) saturado, vía vena yugular, para generar un paro cardiorespiratorio.

Los pulmones recolectados fueron trozados y porciones del parénquima pulmonar fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

6.3. RT-PCR SEMICUANTITATIVO

6.3.1. Extracción de RNA total

Se utilizó el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, USA), siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Brevemente, utilizando un homogeneizador metálico de tipo *tissumizer* (modelo TH, Omni *International*) se homogeneizó 120 mg de pulmón (balanza modelo *SCOUT*, *Ohaus*) con 350 mL de solución de lisis de composición: 4 M Tiocianato de guanidina; 0,01 M Tris pH 7,5; β -Mercaptoetanol 0,97 % y una alícuota de 175 μ L de homogeneizado se mezcló con 350 μ L de *buffer* de dilución y se incubó en baño seco (modelo 949040, VWR *Scientific Products*) a 70 °C por 3 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 14.000 x g (centrífuga modelo 16M, *Labnet Spectrafuge*) a temperatura ambiente, descartando el *pellet* y el sobrenadante se mezcló con 200 μ L de etanol al 95 % y se filtró en una columna de sílica. La columna se lavó con 600 μ L de solución de lavado de composición: 60 mM Acetato de potasio; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 a 25 °C; etanol 60 % y se trató el material retenido con

solución de 5 μL DNasa I, 5 μL 0,09 M MnCl_2 y 40 μL *Yellow Core Buffer* (0,0225 M Tris pH 7,5; 1,125 M NaCl; *yellow dye* 0,0025 % (w/v)) por 15 minutos a temperatura ambiente. La digestión se detuvo con 200 μL de *DNase Stop Solution* de composición: 2 M Isotiocianato de guanidina; 4 mM Tris-HCl; etanol 57 %. La columna fue lavada 2 veces más y el RNA total se eluyó finalmente con 100 μL de agua libre de RNasas.

La preparación de RNA total se dividió en alícuotas que fueron almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso y una de estas alícuotas se utilizó para cuantificación espectrofotométrica y para análisis de integridad por electroforesis como se indica a continuación.

Cuantificación espectrofotométrica de RNA total: se realizó midiendo en espectrofotómetro (modelo 6305, *Jenway*) la absorbancia de diluciones del RNA total en agua con DEPC (dietilpirocarbonato) a una longitud de onda de 260 nm. La concentración final del RNA se calculó mediante la fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times (0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}) \times \text{FD}$$

FD = factor de dilución de muestra de muestra de RNA total

A estas mismas diluciones de RNA total también se les midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, para calcular la razón de absorbancias entre 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}), como criterio de pureza, aceptando aquellas preparaciones con un A_{260}/A_{280} mayor de 1,7.

Análisis electroforético de RNA: la integridad de las preparaciones de RNA total se verificó visualizando los rRNA 18S y 28S mediante electroforesis (cubetas BioJSP; fuente de poder modelo 300, *Polyscience*) en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio, en *buffer* de carga azul-celeste 6X a 70 V por 40 minutos, descartando aquellas preparaciones que presentaron degradación.

6.3.2. Síntesis de cDNA

Una representación esquemática de la síntesis y ampliación de secuencias de cDNA puede verse en la **Figura 1**.

Para la síntesis de cDNA se mezcló 2 µg de RNA total con 50 ng de partidores tipo *Random hexamers* (stock a 50 ng/µL), y un mix de dNTPs (stock a 10 mM) en un volumen de 10 µL, se desnaturó a 70 °C por 5 minutos en termociclador (modelo *FTGENE 5D*, *Techne*) para prevenir la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa por adición de un medio de reacción de manera que la composición final fue: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 40 unidades del inhibidor de RNasa y 50 unidades de transcriptasa reversa (*RevertAid™ H Minus M-MuLV RT*, *Molone Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase* (Fermentas, Canadá), en un volumen final de 20 µL. Se incubó por 10 minutos a 25 °C para provocar el apareamiento, luego por 50 minutos a 42 °C para la síntesis del cDNA y finalmente por 15 minutos a 70 °C para detener la reacción. Una vez completa la reacción de transcripción reversa, el remanente de RNA se eliminó mediante tratamiento con 2 unidades de RNasa H por 20 minutos a 37 °C.

En paralelo a cada preparación de cDNA, se llevó a cabo un control negativo en ausencia de transcriptasa reversa (preparación cDNA (-)). Todos los productos de reacción se guardaron en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Antes de su uso para PCR semicuantitativo, la calidad del cDNA sintetizado se verificó amplificando por PCR una región del gen de 18SrRNA, bajo las condiciones indicadas en la **Tabla 1**.

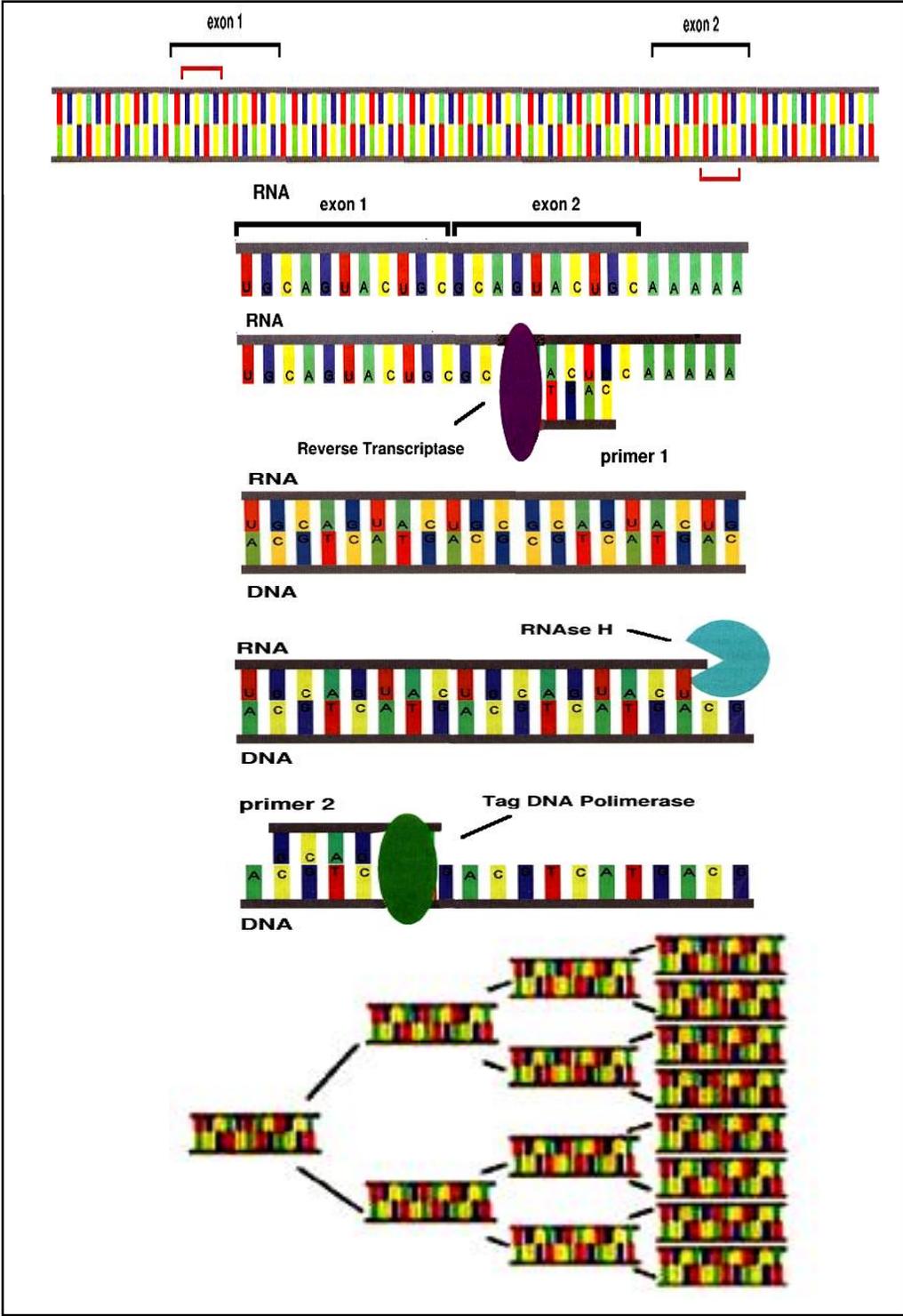


Figura 1: Representación esquemática de RT-PCR.

Modificado de Universidad de Heidelberg, RT-PCR

6.3.3. Amplificación de secuencias parciales de cDNA mediante PCR

La amplificación de secuencias parciales de cDNA de PPET-1, receptores ET_A, ET_B y 18SrRNA se realizó a partir de una alícuota de cDNA procedente de 0,2 µg de RNA total, con 1 unidad de Taq polimerasa (Promega, USA) en 10 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 % Tritón X-100, 2 mM MgCl₂ para la PPET-1 y los receptores ET_A y ET_B y 1,5 mM MgCl₂ para 18SrRNA, 200 µM dNTP y 0,1 µM de cada uno de los partidores bajo las condiciones indicadas en la **Tabla 1**:

Tabla 1: Secuencias de los partidores y condiciones usadas para PCR.

mRNA	Secuencia 5'→3'	T° apareamiento (°C)	Ciclos de amplificación	N° acceso <i>Entrez Nucleotide</i>	Tamaño producto (pb)
ET_A					
<i>Forward</i>	TTTCATCGTGGGAATGGTG	54	27 (oveja)	NM001009433 <i>Ovis aries</i>	370
<i>Reverse</i>	GAAAGGATCCAGATGGAGAC		27 (llama)		
ET_B					
<i>Forward</i>	CGAGCTGTTGCTTCTTGGAG	53	29 (oveja)	NM007904 <i>Mus musculus</i>	570
<i>Reverse</i>	TTGCTCACCAAATACAGAGC		26 (llama)		
PPET-1					
<i>Forward</i>	CTCTGCTGTTTGTGGCTTTCCA	57	31 (oveja)	NM001009810 <i>Ovis aries</i>	314
<i>Reverse</i>	AGCACACTGGCATCTCTTCC		30 (llama)		
18SrRNA					
<i>Forward</i>	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	54	19 (oveja)	BK000964 <i>Mus musculus</i>	494
<i>Reverse</i>	GGACATCTAAGGGCATCACA		13 (llama)		

Para todas las reacciones, se realizaron preliminarmente experimentos para determinar el número de ciclos de PCR hasta la saturación. Los experimentos definitivos fueron realizados con el número de ciclos establecidos en la **Tabla 1**.

Estos partidores fueron diseñados principalmente a partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes de interés en otras especies, como rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*), perro (*Canis familiaris*), vaca (*Bos taurus*), gato (*Felis catus*) y en oveja (*Ovis aries*)

disponibles en los bancos de datos de genes a nivel nucleotídico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) y a nivel proteico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Protein>) y fueron alineadas por medio del programa *ClustalW* (<http://align.genome.jp>) ya que no hay registro previo de estos genes en llama y los registros en oveja se limitaban a PPET-1 y receptor ET_A y secuencias parciales de 18SrRNA y receptor ET_B. Los partidores se eligieron de regiones con alta conservación entre especies y poca variabilidad codogénica con el objetivo de minimizar el efecto de preferencias codogénicas distintas en la llama y la oveja en comparación con las otras especies.

Cuando no se pudo evitar las diferencias de preferencia codogénica entre las distintas especies dentro de la región elegida para el diseño de un partidador, se eligió preferentemente la secuencia de oveja y, si no era posible, la de ratón. Por último, mediante el uso de los programas disponibles en el banco de genes *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), se verificó en ratón que cada partidador de una pareja se encontrara sobre exones distintos, con el fin de prevenir la amplificación de DNA genómico.

Los productos de reacción de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE). Las señales se visualizaron por transiluminación con luz UV, se digitalizaron con un sistema de fotoadquisición (Kodak DC-120 equipado con *software Kodak Digital Science 1D* versión 2.03) y la intensidad de estas señales se cuantificó por densitometría con el *software Scion Image (Scion Image Beta 4.02 Win; Scion Corporation, MD, USA)*. Las condiciones de PCR semicuantitativa indicadas en la **Tabla 1** son aquellas que preceden a la saturación y fueron establecidas en una serie de experimentos en los que se midió la intensidad de la señal para cada set de partidores y para cada especie.

6.4. INMUNOBLOT

Una representación esquemática del procedimiento para el *immunoblot* puede verse en la **Figura 2**.

El procedimiento comenzó con la homogeneización de 0,5 g de tejido pulmonar en 10 volúmenes de *buffer* de lisis de composición: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 14 mM β -mercaptoetanol y 0,1 % tween-20, suplementado con 0,5 mM PMSF, 0,001 mM pepstatina A y 0,002 mM leupeptina como *cocktail* de inhibidores de proteasas. El lisado se mantuvo en hielo por 30 minutos con agitación ocasional y finalmente se centrifugó a 10.000 x g. por 10 minutos a 4 °C (ultracentrífuga modelo GS-15R, *Beckman*). Se recolectó el sobrenadante y se guardó en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas del extracto se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas del extracto, a concentración creciente (5, 10, 20, 35, 50 μ g/pocillo), fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, bajo condiciones desnaturalantes con dodecil sulfato de sodio (SDS), en buffer 25 mM Tris pH 8,3, 250 mM glicina y 1 % SDS a una corriente constante de 20 mA por gel (Laemmli, 1970).

Una vez separadas, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) en *buffer* 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, a un voltaje constante de 50 V por 2 horas (Towbin y Gordon, 1984).

Las membranas se incubaron por una hora a temperatura ambiente en plataforma oscilante (modelo 5047, *Köttermann-KG*) con leche descremada al 4 % en *buffer* fosfato salino (PBS, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4, 140 mM NaCl).

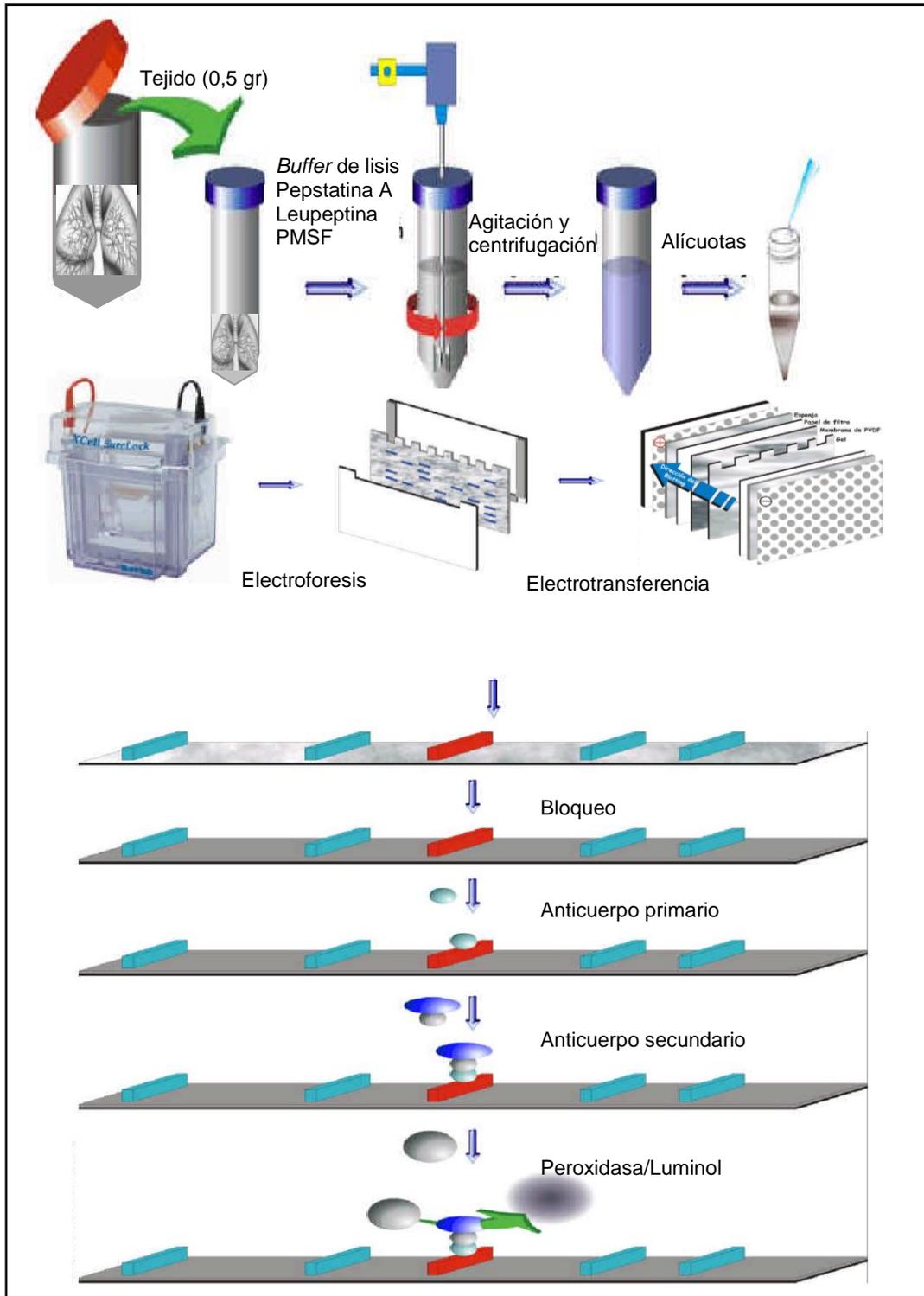


Figura 2: Representación esquemática de *immunoblot*.
Modificado de Prionics®-Check

A continuación, fueron incubados una hora más con los anticuerpos primarios policlonales de conejo, antiET_A o antiET_B en las diluciones indicadas en la **Tabla 2**.

Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS-0,1 % *tween-20* para remover el exceso de anticuerpo primario, se incubaron por una hora a temperatura ambiente con dilución 1:5000 de anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa (*Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA*)

Finalmente, se lavaron 3 veces más con PBS-0,1 % *tween-20* para remover el exceso de anticuerpo secundario. Las señales se visualizaron por quimioluminiscencia, con un kit comercial de peroxidasa/luminol (*Super Signal West Pico ECL, Pierce, USA*) y se revelaron por autorradiografía con tiempos de exposición variables según la intensidad de emisión.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados.

Receptor	Laboratorio	Localización epítope	Epítope	Dilución
ET _A	<i>Alomone Labs</i> (Jerusalén, Israel)	Intracelular, carboxilo-terminal	NHNTERRSSHKDSMN, corresponde a los residuos aminoacídicos 413-426 de rata (Acceso P21451 , <i>Entrez Protein</i>)	(oveja) 1:200 (a) (llama) 1:200 (f)
	<i>Assay Design</i> (Michigan, USA)	Intracelular, carboxilo-terminal	Péptido sintético de extremo carboxilo-terminal de receptor ET _A humano, secuencia no determinada	(oveja) 1:100 (b) (llama) 1:100 (g)
	<i>Assay Design</i> (Michigan, USA)	Extracelular, amino-terminal	Péptido sintético de extremo amino-terminal de receptor ET _A humano, secuencia no determinada	(oveja) 1:50 (c) (llama) 1:50 (h)
ET _B	<i>Alomone Labs</i> (Jerusalén, Israel)	Intracelular, tercer <i>loop</i>	CEMLRKKSGMQIALND, corresponde a los residuos aminoacídicos 298-314 de rata (Acceso P21451 ; <i>Entrez Protein</i>)	(oveja) 1:200 (d) (llama) 1:200 (i)
	<i>Assay Design</i> (Michigan, USA)	Intracelular, carboxilo-terminal	Péptido sintético de extremo carboxilo-terminal de receptor ET _B humano, secuencia no determinada	(oveja) 1:50 (e) (llama) 1:50 (j)

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de RT-PCR se expresaron como promedio \pm desviación estándar de la razón entre ET_A, ET_B o PPET-1 y 18SrRNA. Para realizar el análisis estadístico de los datos se empleó el programa computacional Prisma (*GraphPad Prism* version 4.00 para *Windows*, *GraphPad software*, San Diego, California, USA). El análisis estadístico de los datos fue realizado con un test *Mann-Whitney*.

Se consideró un $p \leq 0.05$ como significativo cuando se compararon los rangos entre ovejas recién nacidas de tierras bajas y altas y entre llamas recién nacidas de tierras bajas y altas (Glantz, 1981).

8. RESULTADOS

8.1. Peso y edad de ovejas y llamas recién nacidas

No se observaron diferencias significativas de edad entre las ovejas recién nacidas de tierras bajas ($11,7 \pm 0,7$ días) y tierras altas ($10,0 \pm 1,0$ días). Sin embargo, el peso de estos últimos fue significativamente menor ($7,2 \pm 0,4$ kg, tierras bajas vs. $4,9 \pm 0,3$ kg, tierras altas, $p \leq 0.05$). Tanto la edad como el peso fueron similares en las llamas recién nacidas de tierras bajas ($11,0 \pm 0,9$ días, $13,9 \pm 1,3$ kg) y las llamas recién nacidas de tierras altas ($12,2 \pm 1,6$ días, $12,2 \pm 1,2$ kg).

8.2. Cuantificación y análisis electroforético de RNA total

Previo a su uso en la determinación de la expresión del mRNA de los genes ET_A , ET_B y PPET-1, el RNA total purificado se sometió a medición espectrofotométrica y electroforesis en gel de agarosa según lo indicado en la sección “Materiales y Métodos” para determinación de concentración, pureza e integridad del RNA. La razón A_{260}/A_{280} de las preparaciones de RNA total se mantuvo dentro del rango 1,7-2,1, que indica un buen grado de pureza con el procedimiento utilizado (**Tabla 3**). Por otra parte, en el análisis electroforético de estas preparaciones se visualizó claramente dos bandas mayoritarias correspondientes a las subunidades 18S y 28S rRNA, lo que sugiere que no hay degradación y que el RNA total extraído es de buena calidad para la cuantificación de mRNA (**Figura 3**).

Tabla 3: Cuantificación espectrofotométrica de RNA total

Nº animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RNA (µg/µL)
OVRNTB 1	0,183	0,094	1,95	1,46
OVRNTB 2	0,260	0,130	2,00	2,08
OVRNTB 3	0,297	0,164	1,81	2,38
OVRNTB 4	0,350	0,164	2,13	2,80
OVRNTB 5	0,227	0,109	2,08	1,82
OVRNTA 1	0,311	0,159	1,96	2,49
OVRNTA 2	0,278	0,135	2,06	2,22
OVRNTA 3	0,485	0,254	1,91	3,88
OVRNTA 4	0,312	0,163	1,91	2,50
OVRNTA 5	0,275	0,140	1,96	2,20
OVRNTA 6	0,377	0,188	2,01	3,02
LLRNTB 1	0,052	0,026	2,00	0,42
LLRNTB 2	0,090	0,046	1,96	0,72
LLRNTB 3	0,068	0,033	2,06	0,54
LLRNTB 4	0,057	0,029	1,97	0,46
LLRNTB 5	0,044	0,021	2,10	0,35
LLRNTB 6	0,046	0,027	1,70	0,37
LLRNTA 1	0,031	0,015	2,07	0,25
LLRNTA 2	0,079	0,043	1,84	0,63
LLRNTA 3	0,063	0,033	1,91	0,50
LLRNTA 4	0,059	0,030	1,97	0,47
LLRNTA 5	0,040	0,020	2,00	0,32

OVRNTB, oveja recién nacida de tierras bajas; OVRNTA, oveja recién nacida de tierras altas; LLRNTB, llama recién nacida de tierras bajas; LLRNTA, llama recién nacida de tierras altas.

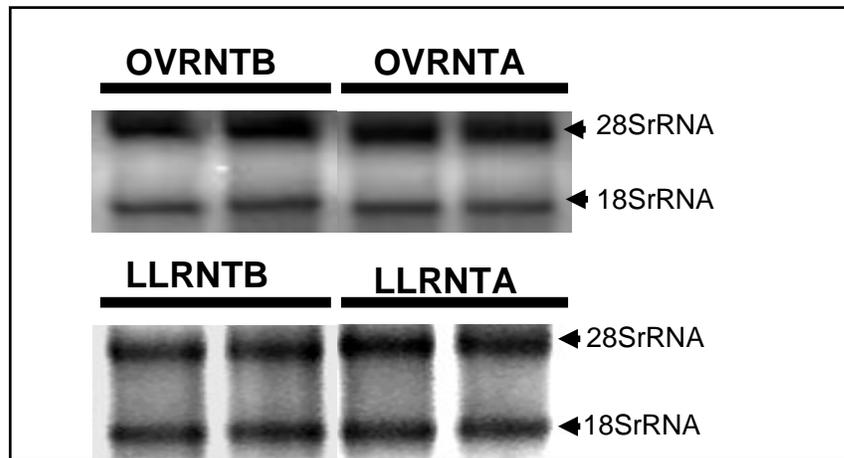


Figura 3: Análisis electroforético de rRNA 18S y 28S.

Se observan muestras representativas de cada grupo, se cargaron 2 μ g de RNA total por pocillo en un gel de agarosa al 1,5 %.

8.3. Verificación de calidad de la síntesis de cDNA

La calidad de los cDNA sintetizados se verificó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen 18SrRNA. En todos los cDNA de pulmón de oveja y de llama sintetizados se amplificó adecuadamente este fragmento del gen, sugiriendo que la reacción de transcripción reversa tuvo un buen rendimiento (**Figura 4**).

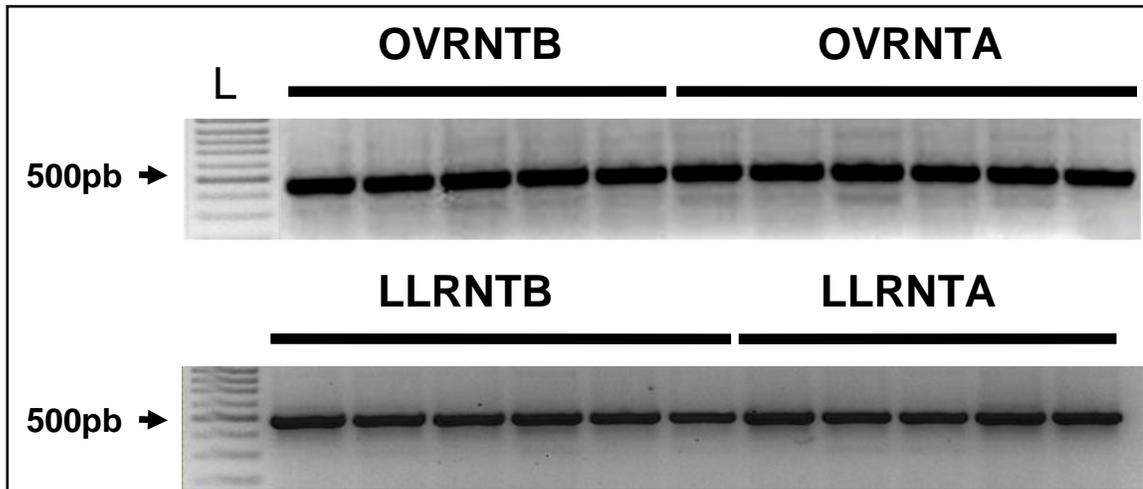


Figura 4: Verificación de transcripción reversa por amplificación de secuencia parcial del gen 18SrRNA

Se realizaron 25 ciclos de amplificación de una secuencia parcial del gen 18SrRNA desde alícuotas de cDNA sintetizados a partir de 0,2 μg de RNA total. Se cargaron 15 μL de un total de 25 μL de reacción de PCR en un gel de agarosa al 1,5 %. L, DNA ladder.

8.4. Determinación del número de ciclos de amplificación para PCR semicuantitativa

Las **Figuras 5 y 6** representan los resultados de los experimentos de determinación de número de ciclos de amplificación *versus* intensidad de la señal del fragmento amplificado para los genes 18SrRNA, PPET-1, ET_A y ET_B en pulmón de ovejas y llamas recién nacidas, respectivamente. En función de estos resultados, se determinó realizar los experimentos de PCR semicuantitativo en las preparaciones de pulmón de oveja con 19, 31, 27 y 29 ciclos para los genes de 18SrRNA, PPET-1, ET_A y ET_B, respectivamente, mientras que en las preparaciones de pulmón de llama, se eligió realizar las semicuantificaciones con 13, 30, 27 y 26 ciclos respectivamente, ya que la reacción se encuentra en una fase que precede la saturación.

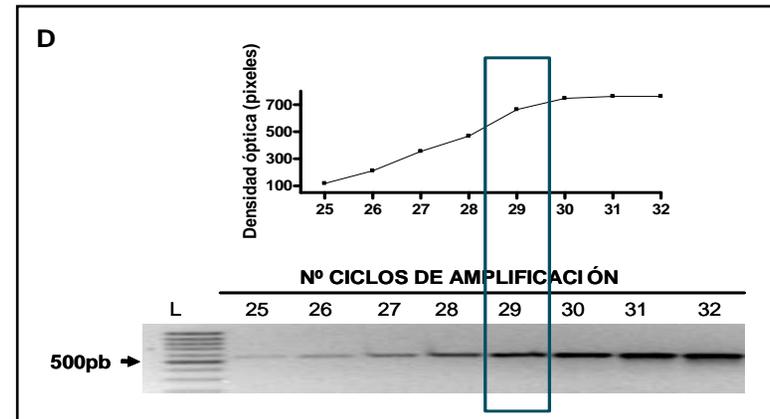
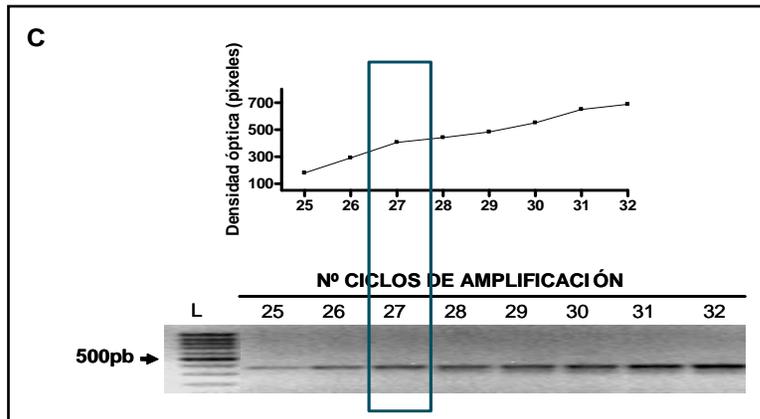
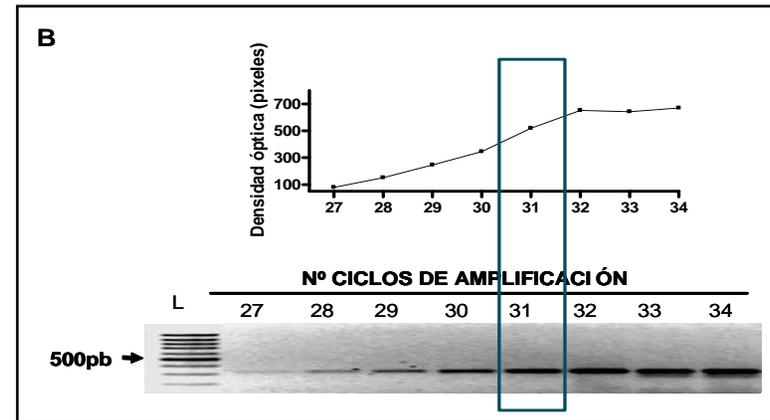
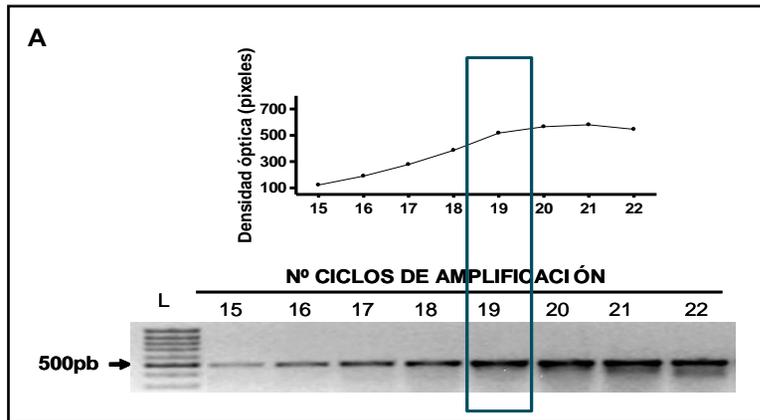


Figura 5: Número de ciclos de amplificación para un fragmento de los genes 18SrRNA, PPET-1, ET_A y ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas.

Intensidad de la señal de una secuencia parcial de los genes 18SrRNA (A), PPET-1 (B), ET_A (C) y ET_B (D) en función del número de ciclos de amplificación en cDNA de pulmón ovejas recién nacidas. El gráfico representa el número de ciclos utilizado en la semicuantificación posterior. En la parte inferior se observa el gel de agarosa del que se obtuvo el resultado.

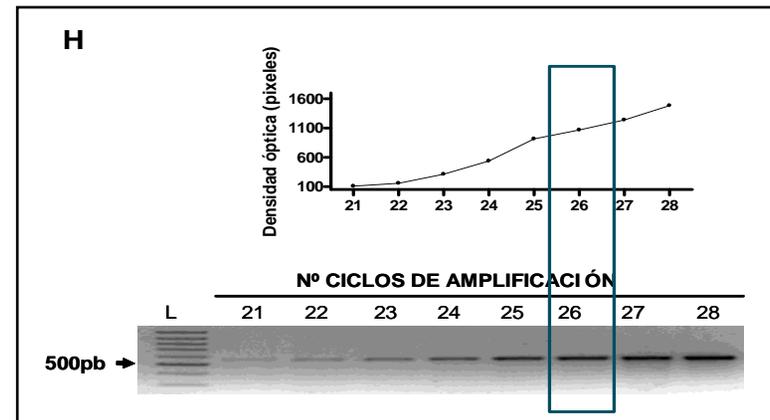
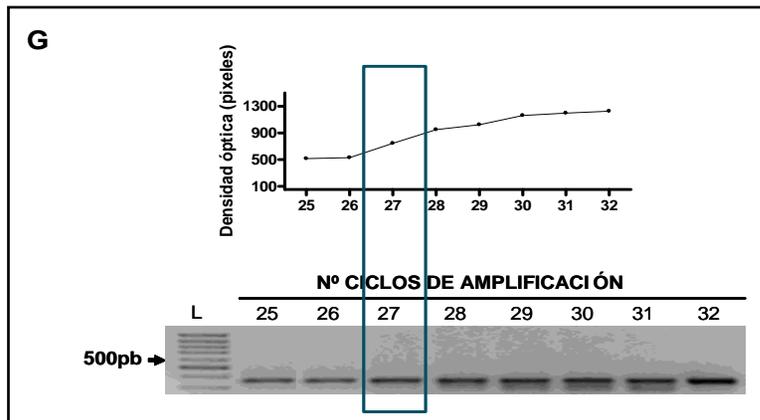
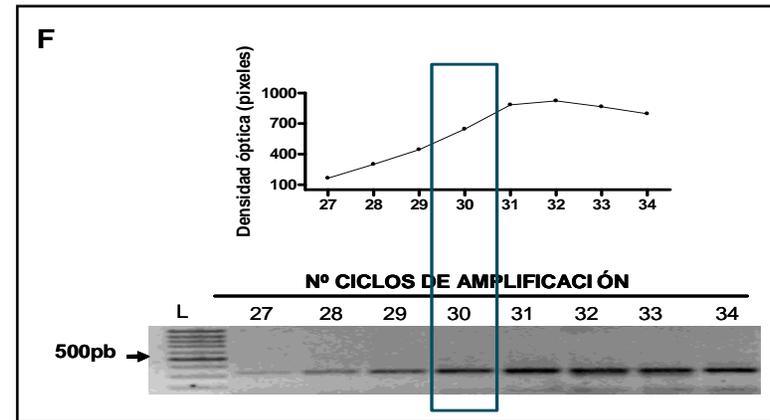
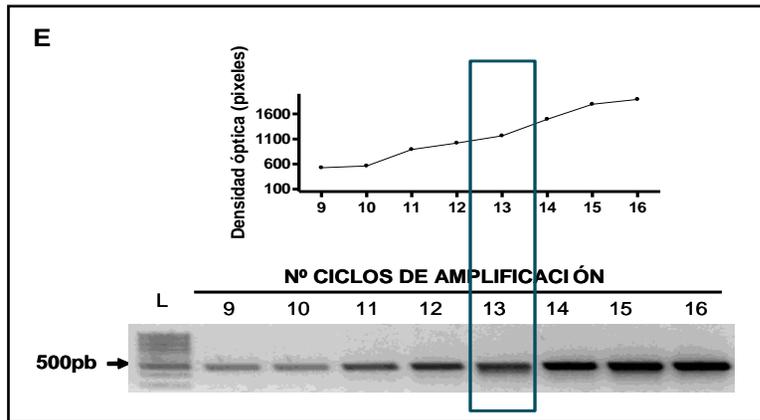


Figura 6: Número de ciclos de amplificación para un fragmento de los genes 18SrRNA, PPET-1, ET_A y ET_B en pulmón de llamas recién nacidas.

Intensidad de la señal de una secuencia parcial de los genes 18SrRNA (E), PPET-1 (F), ET_A (G) y ET_B (H) en función del número de ciclos de amplificación en cDNA de pulmón de llamas recién nacidas. El gráfico representa el número de ciclos utilizado en la semicuantificación posterior. En la parte inferior se observa el gel de agarosa del que se obtuvo el resultado.

8.5. Expresión de transcritos de PPET-1, ET_A y ET_B en recién nacidos de tierras bajas y altas

Las OVRNTA presentan niveles de transcritos significativamente mayores de PPET-1, receptores ET_A y ET_B que las OVRNTB (**Figura 7**). Por otra parte, no se observan diferencias significativas en la expresión de transcritos de PPET-1, receptores ET_A y ET_B entre LLRNTB y LLRNTA (**Figura 8**).

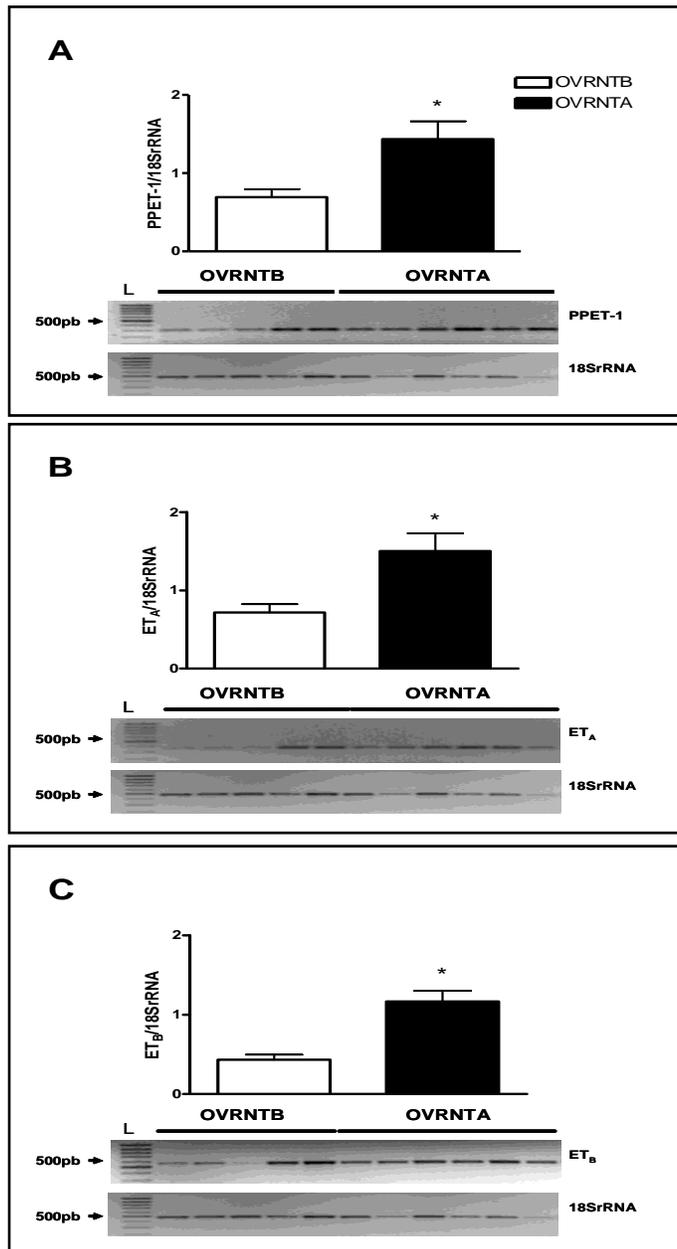


Figura 7: Expresión del mRNA de PPET-1, ET_A y ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas.

Se amplificó una secuencia parcial de los genes PPET-1, ET_A y ET_B y 18SrRNA desde cDNA sintetizados a partir de 0,2 µg de RNA total de pulmón de oveja, según lo indicado en “Materiales y Métodos”. En los gráficos, cada barra representa el promedio \pm desviación estándar de las razones de los fragmentos de los genes PPET-1/18SrRNA (A), ET_A/18SrRNA (B) y ET_B/18SrRNA (C) para 5 OVRNTB y 6 OVRNTA. En la parte inferior se observa el gel de agarosa del que se obtuvo el resultado. *, $p \leq 0.05$, OVRNTB versus OVRNTA.

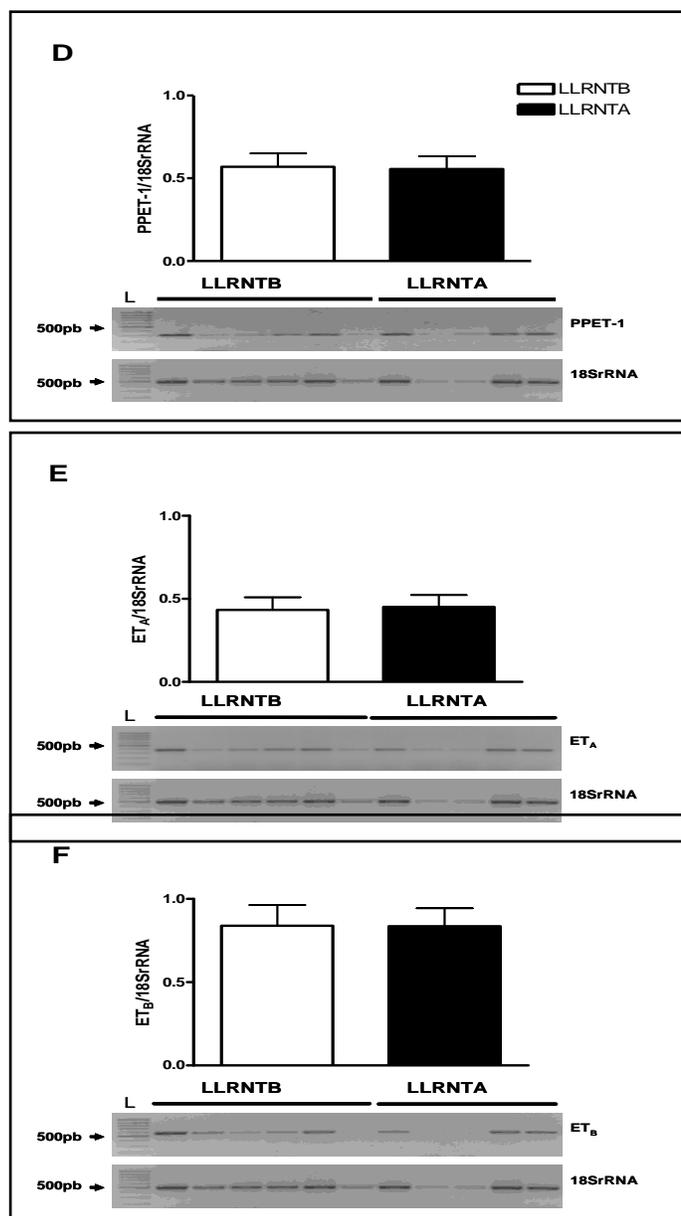


Figura 8: Expresión del mRNA de PPET-1, ET_A y ET_B en pulmón de llamas recién nacidas.

Se amplificó una secuencia parcial de los genes PPET-1, ET_A y ET_B, PPET-1 y 18SrRNA desde cDNA sintetizados a partir de 0,2 µg de RNA total de pulmón de llama, según lo indicado en “Materiales y Métodos”. En los gráficos, cada barra representa el promedio ± desviación estándar de las razones de los fragmentos de los genes PPET-1/18SrRNA (D), ET_A/18SrRNA (E) y ET_B/18SrRNA (F) para 6 LLRNTB y 5 LLRNTA. En la parte inferior se observa el gel de agarosa del que se obtuvo el resultado.

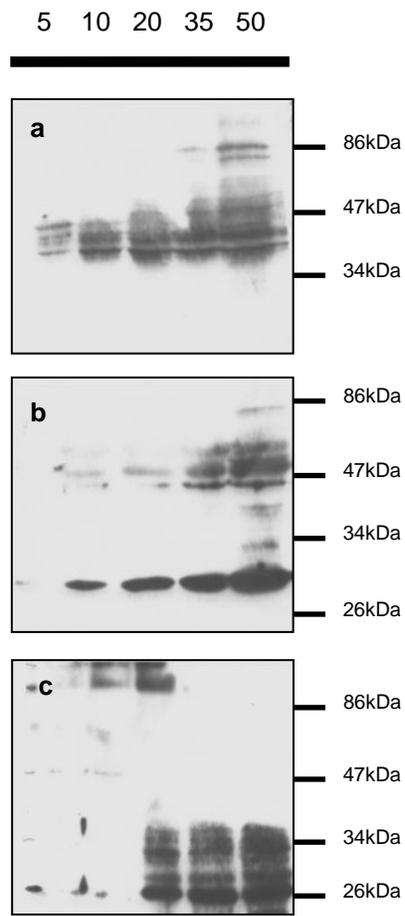
8.6. Ensayos de *Inmunoblot*

Se realizaron ensayos de *inmunoblot* con 3 anticuerpos primarios policlonales antiET_A y 2 anticuerpos policlonales antiET_B procedentes de 2 laboratorios, *Alomone Labs* y *Assay Designs*, dirigidos contra distintas porciones de estos receptores según lo indicado en la **Tabla 2**. Se probó la capacidad de estos anticuerpos de detectar los receptores ET_A y ET_B en extractos proteicos de pulmón de ovejas y llamas recién nacidas. Las **Figuras 9 y 10** muestran los resultados de estos experimentos de *inmunoblot* en extractos de pulmón ovejas y llamas recién nacidas, respectivamente.

Pese a que se ensayaron distintas diluciones de cada anticuerpo y diferentes cantidades de proteína pulmonar por pocillo, en el gel, ninguno de estos anticuerpos permitió detectar de manera específica y nítida en llama u oveja, una señal de peso molecular esperado entre 48 (oveja y ratón) y 49 kDa (ratón), para los receptores ET_A y ET_B.

Los resultados sugieren que estos anticuerpos policlonales antiET_A y antiET_B preparados contra los receptores de rata o humano no reconocen los receptores en forma específica en pulmón de oveja y de llama por lo que desechó el *inmunoblot* como estrategia para medir su expresión a nivel de proteína en estas especies.

Anticuerpo antiET_A



Anticuerpo antiET_B

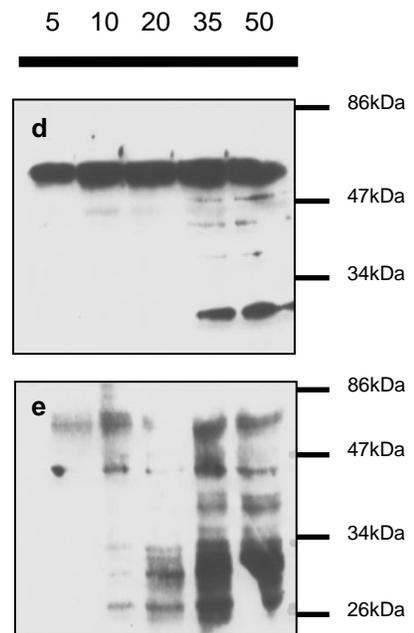
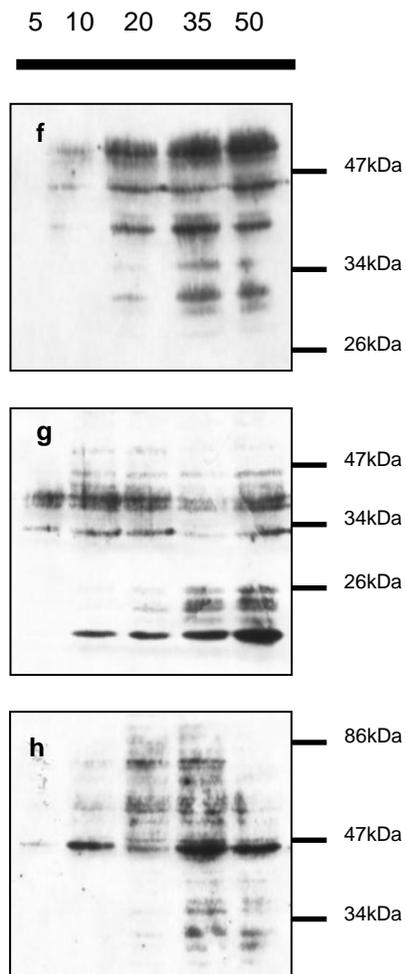


Figura 9: ensayo de *immunoblot* de receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas.

Cantidades de 5, 10, 20, 35 y 50 μg de proteína de pulmón de ovejas recién nacidas fueron sometidas a electroforesis, transferidas a membranas de PVDF y ensayadas con cada uno de los siguientes anticuerpos según lo indicado en la **Tabla 2**: (a), antiET_A C-terminal *Alomone Labs*; (b), antiET_A C-terminal *Assay Designs*; (c), antiET_A N-terminal *Assay Designs*; (d), antiET_B tercer *loop* intracelular *Alomone Labs*; (e), antiET_B C-terminal *Assay Designs*.

Anticuerpo antiET_A



Anticuerpo antiET_B

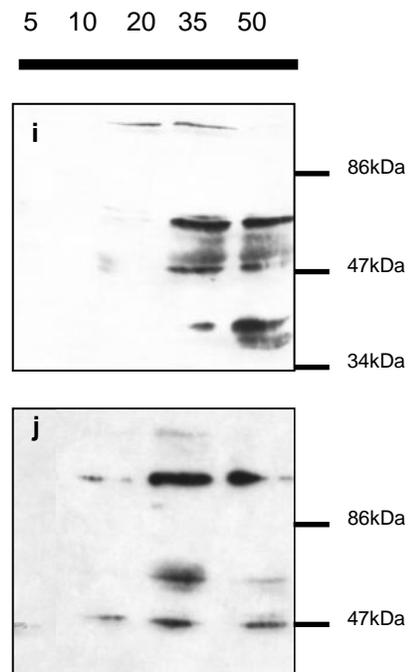


Figura 10: ensayo de *immunoblot* de receptores ET_A y ET_B en pulmón de llamas recién nacidas.

Cantidades de 5, 10, 20, 35 y 50 µg de proteína de pulmón de llamas recién nacidas fueron sometidas a electroforesis, transferidas a membranas de PVDF y ensayadas con cada uno de los siguientes anticuerpos según lo indicado en la **Tabla 2**: (f), antiET_A C-terminal *Alomone Labs*; (g), antiET_A C-terminal *Assay Designs*; (h), antiET_A N-terminal *Assay Designs*; (i), antiET_B tercer *loop* intracelular *Alomone Labs*; (j), ET_B C-terminal *Assay Designs*.

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son importantes debido a que éste es el primer estudio que compara la expresión de algunos componentes del sistema de señalización mediado por endotelinas en pulmón de recién nacidos gestados y nacidos en un ambiente de hipoxia crónica, como ocurre en la altura (tierras altas, 3.600 m.s.n.m), con recién nacidos gestados y nacidos en un ambiente no hipóxico o cercano a nivel del mar (tierras bajas, 580 m.s.n.m).

Por otra parte, se compara si existen o no diferencias en la expresión del sistema de endotelinas modulado por hipoxia crónica, entre especies que han evolucionado en tierras bajas como la oveja y aquellas que lo han hecho en tierras altas como la llama.

En este estudio, se demostró que la hipoxia crónica de altura: 1) induce un aumento de la expresión de mRNA de PPET-1 y de receptores ET_A y ET_B en pulmón de ovejas recién nacidas; 2) reduce el peso al nacimiento en ovejas recién nacidas y 3) no modifica significativamente la expresión de mRNA de PPET-1 y de receptores ET_A y ET_B en pulmón de llamas recién nacidas.

A nivel transcripcional, hubo diferencias entre ovejas recién nacidas gestadas y nacidas de tierras bajas y altas. La expresión de mRNA de PPET-1 fue significativamente mayor en un 107,6 % en pulmón de ovejas recién nacidas en altura, sometidas a hipoxia crónica, al compararlas con animales de tierras bajas. Esto concuerda con estudios en ratas donde la exposición a hipoxia crónica aumenta la expresión de mRNA de PPET-1 y ET-1 en pulmón y ET-1 plasmática; junto con esto, se produce un aumento significativo en la presión arterial pulmonar (Li *et al.*, 1994; Nakanishi *et al.*, 1999; Kanazawa *et al.*, 2005).

La ET-1, que contribuye a la regulación del tono vascular pulmonar fetal (Ivy *et al.*, 1994), provoca aumento de la presión arterial pulmonar, lo cual ha sido demostrado en diversas especies en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Li *et al.*, 1994; Goerre *et al.*, 1995;

Morganti *et al.*, 1995; Semenza, 2000; Beall, 2001; Suguihara, 2001; Ao *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2002; Galié *et al.*, 2004; Wojciak-Stothard y Haworth, 2006). También, en pulmón de ovejas recién nacidas gestadas y nacidas en altura se ha establecido que la presión arterial y la resistencia vascular son significativamente mayores que la de ovejas recién nacidas gestadas y nacidas en tierras bajas (Herrera *et al.*, 2004a; Herrera *et al.*, 2007a; Herrera *et al.*, 2007b). Estos resultados son consistentes con niveles de ET-1 inmunorreactiva elevados en niños con HPPRN e hipertensión arterial pulmonar primaria o secundaria asociada a enfermedades cardíacas y pulmonares (Allen *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1996) y en lechones expuestos a hipoxia crónica (Perreault y Coceani, 2003). En adultos, se ha detectado un aumento de mRNA de PPET-1 en humanos con hipertensión arterial pulmonar secundaria a una variedad de etiologías (Giaid *et al.*, 1993), así como elevados niveles plasmáticos de ET-1 han sido reportados en humanos y animales con hipertensión pulmonar primaria y secundaria (Mac Lean, 1998) y en humanos sometidos a hipoxia crónica experimental (Shimoda *et al.*, 2000) y ambiental, tal como ocurre con el ascenso en la altitud (Morganti *et al.*, 1995). Sin embargo, también se ha reportado que la expresión del transcrito y la proteína de PPET-1 no cambió en ovejas recién nacidas, con hipertensión pulmonar crónica causada por ligadura del *ductus arteriosus in utero*, mientras que aumentó la expresión de ECE-1 y también los niveles plasmáticos de ET-1 (Black *et al.*, 2000). Las discrepancias reportadas en la expresión de los transcritos podrían ser atribuidas a diferencias en la maduración postranscripcional de la ET-1 y al tiempo de exposición a hipoxia crónica y posterior desarrollo de hipertensión arterial pulmonar en los diversos modelos experimentales.

El mecanismo por el cual el nivel de ET-1 se eleva en respuesta a la hipoxia no se conoce completamente, sin embargo, parte de la explicación podría estar dada por un aumento en la expresión génica de PPET-1 a través de un proceso transcripcional mediado por HIF-1 (Hu *et al.*, 1998; Semenza, 2000; Ao *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2002; Semenza, 2004).

La expresión del mRNA de los receptores ET_A y ET_B fue mayor en ovejas recién nacidas de tierras altas. Comparadas con el grupo de tierras bajas, los animales

sometidos a hipoxia crónica tienen un 108,8 % y 169,0 % mayor expresión de mRNA en los receptores ET_A y ET_B, respectivamente. Este resultado concuerda con un experimento en corderos con hipertensión pulmonar crónica en donde aumentó la expresión génica y proteica del receptor ET_A. Igualmente, lechones tratados con un antagonista del receptor ET_A revierten la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica (Perreault y Coceani, 2003). Se sabe que la estimulación del receptor ET_A contribuye a la fisiopatología de hipertensión pulmonar perinatal. El bloqueo del receptor ET_A en ovejas recién nacidas atenúa la progresión de hipertensión pulmonar crónica iniciada en la etapa fetal (Black *et al.*, 2000; Fratz *et al.*, 2004), disminuye la presión arterial pulmonar, hipertrofia ventricular derecha y la muscularización de pequeñas arterias pulmonares e incrementa la caída en la resistencia vascular pulmonar en el momento del parto (Ivy *et al.*, 1996a; Ivy *et al.*, 1997; Coe *et al.*, 2002; Fratz *et al.*, 2004). Sumado a esto, en experimentos *ex vivo* en arterias pulmonares de ovejas recién nacidas de tierras altas hay una mayor respuesta a K⁺ que en ovejas recién nacidas de tierras bajas. Esta mayor respuesta contráctil es compatible con una mayor masa muscular que podría ser inducida por acción de la ET-1, mitogénica para la célula muscular lisa, al unirse al receptor ET_A (Masaki *et al.*, 1999; Galié *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007).

Por otro lado, hay estudios que indican que el bloqueo del receptor ET_A falla en inhibir la vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia aguda en pulmones aislados o en animales intactos (Shimoda *et al.*, 2002). Sin embargo, otros datos apoyan el rol fundamental de la ET-1 y el receptor ET_A, cuyo bloqueo previene la vasoconstricción pulmonar en una variedad de especies (Shimoda *et al.*, 2002). Por ejemplo, en experimentos llevados a cabo en ovejas recién nacidas con antagonistas del receptor ET_A que resultaron ser potentes inhibidores de la vasoconstricción pulmonar resultante de hipoxia aguda (Coe *et al.*, 2002). Las razones de la discrepancia entre los estudios no están claras, se podrían relacionar con las especies estudiadas, etapa del desarrollo, otros factores derivados endotelio o duración del estímulo hipóxico que podría modular la respuesta. No se ha demostrado que el HIF-1 estimule la expresión de los receptores de ET-1, sin embargo, la hipoxia crónica podría tener efectos directos sobre la célula endotelial y muscular lisa vascular, modulando la población de

receptores, la actividad de canales iónicos o vías de transducción de señales (Shimoda *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2002).

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, en diversos modelos experimentales, se asocia una disminución de la expresión del receptor ET_B con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica (Ivy *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2000). Esto sugiere que el aumento en la producción de ET-1 y disminución de la expresión del receptor ET_B podrían contribuir al incremento en el tono vasoconstrictor en la hipertensión pulmonar (Ivy *et al.*, 1998). Esta reducción en la expresión del receptor ET_B y por lo tanto en el *clearance*, también podría explicar la elevación de los niveles circulantes de ET-1 (Perreault y Coceani, 2003).

Aunque la expresión génica del receptor ET_B aumenta la final de la gestación (125-135 días), el balance de la actividad de los receptores ET_A y ET_B favorecen la vasoconstricción sobre la vasodilatación en el feto ovino (Ivy *et al.*, 2000a). La expresión de ambos receptores ET_B, ya sea en la célula endotelial o muscular lisa vascular, durante la etapa gestacional varía dependiendo del modelo animal estudiado (Ivy *et al.*, 1994; Ivy *et al.*, 1996b; Perreault y Coceani, 2003). En fetos ovinos, transcurrido un 85-93% de gestación, el receptor ET_B de la célula muscular lisa vascular no presentaría expresión funcional (Ivy *et al.*, 1994), por lo tanto, no mediaría vasoconstricción en la etapa fetal. Además, la estimulación prolongada del receptor ET_B con el agonista sarafotoxina S6c, causa sólo vasodilatación, confirmando la presencia sólo del receptor ET_B endotelial en pulmón de feto ovino (Ivy *et al.*, 1994). También, el bloqueo selectivo del receptor ET_B causa hipertensión pulmonar y remodelación vascular pulmonar en fetos ovino a término, elevación de la presión arterial y resistencia vascular pulmonar, anormal vasorreactividad, hipertrofia del ventrículo derecho, cambios estructurales pulmonares hipertensivos (Ivy *et al.*, 1994; Ivy *et al.*, 2000a; Ivy *et al.*, 2000b). Además, la expresión de ambos receptores ET_B es tiempo y especie dependiente, la inmunodetección del receptor ET_B en el desarrollo postnatal de ratas comienza en diversos lechos vasculares pero se observa en la capa media de la arteria pulmonar y arterias coronarias recién el día 21 de edad (Wendel *et al.*, 2005). En ovinos, se ha determinado un aumento significativo en la expresión a

nivel de mRNA del receptor ET_B el día 13 posterior al nacimiento (Ivy *et al.*, 2000a), sin llegar a determinarse si se trata del receptor ET_B de la célula endotelial o muscular lisa vascular.

Todo lo anterior refuerza la idea que la activación del receptor ET_B en el pulmón de feto de oveja favorecería preferentemente la vasodilatación y que por otra parte, no se sabe en que momento de la etapa neonatal el receptor ET_B empezaría a mediar vasoconstricción. Por lo tanto, en este estudio el aumento en la expresión del receptor ET_B en las ovejas recién nacidas de tierras altas, que desarrollan hipertensión arterial pulmonar, podría atribuirse a que el receptor ET_B ha asumido su rol vasoconstrictor en la célula muscular lisa vascular. Conjuntamente con esto, en estudios realizados en cobayos adultos se ha determinado que la unión de la ET-1 al receptor ET_B endotelial no sólo permite la liberación de óxido nítrico y prostaciclina, mediadores de vasodilatación, sino que también de tromboxano A₂, potente vasoconstrictor pulmonar (Sauvageau *et al.*, 2007). Otra razón que apoya esta interpretación es que en diversos modelos experimentales es necesario el bloqueo de los receptores ET_A y ET_B en forma simultánea para revertir la hipertensión pulmonar hipóxica (Galié *et al.*, 2004; Sauvageau *et al.*, 2007).

Además, en este trabajo se confirma que la hipoxia crónica durante la gestación produce una disminución del peso de ovejas recién nacidas, lo que concuerda con observaciones de otros autores (Parraguez *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2007a). Por otra parte, el peso de los recién nacidos de llama no es afectado por hipoxia crónica *in utero*. Tomadas en su conjunto, estas observaciones sugieren que la hipoxia crónica solo produciría retardo del crecimiento intrauterino en especies con corta residencia en la altura, confirmando observaciones similares realizadas en poblaciones humanas (Giussani *et al.*, 2001; Moore, 2001).

Por otro lado, no existen cambios en la expresión a nivel de mRNA de PPET-1 y los receptores ET_A y ET_B al comparar llamas recién nacidas gestadas y nacidas en un ambiente de hipoxia crónica versus animales gestados y nacidos en un ambiente no hipóxico o cercano al nivel del mar. No existe ningún estudio de determinación o

expresión de algún componente del sistema de endotelinas en llamas. Este es el primer estudio que permite un acercamiento de este sistema a esta especie, comparando si existe alguna diferencia en la expresión en dos grupos de animales expuestos a dos condiciones ambientales diferentes, que sin embargo, no afectan a esta especie, dado que la exposición a hipoxia hipobárica por generaciones y la permanencia en el *altiplano* Andino, su ambiente natural, no altera la expresión génica de PPET-1 y los receptores ET_A y ET_B. Además, las llamas recién nacidas gestadas y nacidas en la altura y las de tierras bajas, no presentan cambios en la presión arterial pulmonar ni en la resistencia vascular pulmonar. Por otra parte, estos animales presentan una menor hipertensión pulmonar durante hipoxia aguda en comparación con las ovejas (Herrera *et al.*, 2004b; Herrera *et al.*, 2007a; Herrera *et al.*, 2007b). En un grupo de camélidos sudamericanos adultos que viven en altura, se demostró que existe un leve aumento de la presión arterial pulmonar en comparación con un grupo de animales que viven cerca del nivel del mar. Sin embargo, este incremento no es suficiente para producir hipertrofia del ventrículo derecho. Además, no existe engrosamiento de la capa muscular del tronco arterial pulmonar ni de pequeñas arterias pulmonares en los animales que viven en la altura (Harris *et al.*, 1982).

Respecto al resto de los miembros del sistema de endotelinas, se sabe poco acerca del rol de ET-2, ET-3, PPET-2, PPET-3, BigET-1, BigET-2, BigET-3, furin convertasa, ECE-1 y sus otras isoformas e incluso del receptor de endotelina ET_C, identificado sólo en tejidos de anfibios (Galié *et al.*, 2004) y de los factores que modularían su expresión y actividad. Futuros estudios podrían involucrar localización subcelular o distribución tisular por inmunohistoquímica de algunos componentes de la familia de las endotelinas, ya que la hipertensión pulmonar podría causar cambios locales que podrían no ser revelados por estudios de la expresión proteica o de mRNA en tejido pulmonar entero. De hecho, se ha demostrado la presencia de ambos receptores, no solo en la membrana plasmática de diversos tipos celulares, sino también en el citosol y, además, del receptor ET_B en el nucleoplasma y membrana nuclear de cardiomiocitos, célula muscular lisa vascular y hepatocitos (Bkaily, *et al.*, 2006), lo que sugiere que pueden ocurrir cambios en la distribución de estos

receptores dentro de la célula que no se acompañen de cambios en la expresión global de los mismos, pero sí de cambios funcionales.

El mejor entendimiento de los mecanismos responsables de estos cambios en la expresión génica podría conducir a una mejor prevención y desarrollo de estrategias para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Con el desarrollo de antagonistas de los receptores como potenciales agentes terapéuticos, estos datos podrían tener importantes implicaciones clínicas (Douglas, 1997; Battistini y Dussault, 1998; Brunner, 1998; MacLean *et al.*, 1998; Domkowski *et al.*, 2000; Ambalavanan *et al.*, 2005; Benza *et al.*, 2007; Ulrich *et al.*, 2007; Wittbrodt y Abubakar, 2007).

La expresión de estos receptores a nivel de proteína no pudo ser determinada debido a que no se obtuvo una señal única y definida que permitiera realizar el análisis densitométrico. Con el uso de diversos métodos, una variedad de pesos moleculares, desde 33 kDa hasta 340 kDa, han sido determinados para ambos receptores de ET-1, siendo la masa molecular deducida a partir de las secuencias aminoacídicas de 48 y 49 kDa para el receptor ET_A y ET_B respectivamente. Esta discrepancia de pesos no solo se deben a diferentes condiciones experimentales, sino que refleja probablemente un splicing de hnRNA tejido-específico o procesamiento intracelular diferentes, posiblemente por glicosilación, acilación u oligomerización. También se puede deber a que diferentes enzimas proteolíticas degradan ambos receptores y que estas enzimas pueden ser expresadas de diferente manera según el tejido estudiado (Bouso-Mittler *et al.*, 1991; Akiyama *et al.*, 1992; Hashido *et al.*, 1992; Kalina y Löffler, 1992; Takasuka *et al.*, 1992; Takasuka *et al.*, 1994; Horstmeyer *et al.*, 1996; Bourgeois *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 1997; Cervar *et al.*, 2000).

Cabe destacar que fueron utilizados anticuerpos procedentes de dos laboratorios para ambos receptores de ET-1, dirigidos contra diferentes epítopes de los receptores (extremos amino y carboxi-terminal y el tercer loop intracelular). Era esperable entonces que dos anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopes de la misma proteína detectaran una señal del mismo peso molecular. Sin embargo, esto no ocurrió y las señales observadas no fueron coincidentes, lo que sugiere que simplemente los

anticuerpos dirigidos contra los receptores de humano o de ratón no tienen buena afinidad en el caso de la oveja o la llama.

Estos resultados tienen importantes proyecciones para definir las adaptaciones fisiológicas de la circulación pulmonar y que permitan prevenir las complicaciones a largo plazo de una gestación en altura. El balance de este sistema afecta el tono vascular pulmonar y el grado en que éste es modificado por hipoxia crónica podría ser determinante en la adaptación pulmonar a la altura, tanto para el desarrollo de la ganadería en el *altiplano* como para la salud pública en asentamientos humanos.

10. CONCLUSIONES

1. En pulmón de ovejas recién nacidas y gestadas en tierras altas, sometidas a hipoxia crónica, la mayor expresión a nivel de mRNA de PPET-1 y de los receptores ET_A y ET_B , sugieren que este sistema podría estar implicado principalmente en el incremento en el tono vasoconstrictor y contribuir al desarrollo de hipertensión pulmonar observada en esta especie.

2. En pulmón de llamas recién nacidas y gestadas en tierras altas, al compararla con llamas recién nacidas y gestadas en tierras bajas, no existe un cambio en la expresión a nivel de mRNA de PPET-1 ni de los receptores de ET-1. Por lo tanto, la ausencia de cambios de expresión en el sistema de endotelinas podría formar parte de los rasgos adaptativos de la circulación pulmonar en esta especie para tolerar la hipoxia crónica.

11. BIBLIOGRAFÍA

ABMAN, S.H.; SHANLEY, P.F.; ACCURSO, F.J. 1989. Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs. *J. Clin. Invest.* 83(6):1849-1858.

ABMAN, S.H. 1999. Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr. Rev.* 20(11):e103-e109.

AKIYAMA, N.; HIRAOKA, O.; FUJII, Y. 1992. Biotin derivatives of endothelin: utilization for affinity purification of endothelin receptor. (Abstract). *Protein Expr. Purif.* 3(5):427-433.

ALLEN, S.W.; CHATFIELD, B.A.; KOPPENHAFFER, S.A.; SCHAFFER, M.S.; WOLFE, R.R.; ABMAN, S.H. 1993. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148(2):519-522.

AMBALAVANAN, N.; BULGER, A.; MURPHY-ULLRICH, J.; OPARIL, S.; CHEN, Y.F. 2005. Endothelin-A receptor blockade prevents and partially reverses neonatal hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Pediatr. Res.* 57(5 Pt 1):631-636.

ANAND, I.S.; HARRIS, E.; FERRARI, R.; PEARCE, P.; HARRIS, P. 1986. Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. (Abstract). *Thorax.* 41(9):696-700.

AO, Q.; HAO, C.; XIONG, M.; WANG, D. 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and endothelin-1 gene in hypoxic pulmonary hypertension. (Abstract). *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 31(2):140-142.

ARCHER, S.; MICHELAKIS, E. 2002. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol. Sci.* 17:131-137.

BARTELS, H.; HILPERT, P.; BARBEY, K.; BETKE, K.; RIEGEL, K.; LANG, E.M.; METCALFE, J. 1963. Respiratory functions of blood of the yak, llama, camel, Dybowski deer, and African elephant. *Am. J. Physiol.* 205(2):331-336.

BATTISTINI, B.; DUSSAULT, P. 1998. Blocking of the endothelin system: the development of receptor antagonists. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 11(2-3):97-112.

BEALL, C.M. 2001. Adaptations to altitude: a current assessment. *Annu. Rev. Anthropol.* 30:423-456.

BENZA, R.L.; MEHTA, S.; KEOGH, A.; LAWRENCE, E.C.; OUDIZ, R.J.; BARST, R.J. 2007. Sitaxsentan treatment for patients with pulmonary arterial hypertension discontinuing bosentan. *J. Heart Lung Transplant.* 26(1):63-69.

BIOINFORMATICS CENTER INSTITUTE FOR CHEMICAL RESEARCH. GenomeNet. Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW. Kyoto University, Japón. [en línea] <<http://align.genome.jp>> [consulta: 24-03-2008].

BKAILY, G.; NADER, M.; AVEDANIAN, L.; CHOUFANI, S.; JACQUES, D.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; GOBEIL, F.; CHEMTOB, S.; AL-KHOURY, J. 2006. G-protein-coupled receptors, channels, and Na⁺-H⁺ exchanger in nuclear membranes of heart, hepatic, vascular endothelial, and smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84(3-4):431-441.

BLACK, S.M.; BEKKER, J.M.; JOHENGEN, M.J.; PARRY, A.J.; SOIFER, S.J.; FINEMAN, J.R. 2000. Altered regulation of the ET-1 cascade in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatr. Res.* 47(1):97-106.

BOURGEOIS, C.; ROBERT, B.; REBOURCET, R. 1997. Endothelin-1 and ET_A receptor expression in vascular smooth muscle cells from human placenta: a new ETA receptor messenger ribonucleic acid is generated by alternative splicing of exon 3. (Abstract). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(9):3116-3123.

BOUSSO-MITTLER, D.; GALRON, R.; SOKOLOVSKY, M. 1991. Endothelin/sarafotoxin receptor heterogeneity: evidence for different glycosylation in receptors from different tissues. (Abstract). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 178(3):921–926.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (Abstract). *Anal. Biochem.* 72:248-254.

BRIJ, S.O; PEACOCK, A.J. 1998. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Thorax* 53(12):1075-1079.

BRUNNER, H.R. 1998. Endothelin inhibition as a biologic target for treating hypertension. *Am. J. Hypertens.* 11(4 Pt 3):103S-109S.

CARVILLE, C.; RAFFESTIN, B.; EDDAHIBI, S.; BLOUQUIT, Y.; AANOT, S. 1993. Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine. (Abstract). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22(6):889-896.

CERVAR, M.; HUPPERTZ, B.; BARTH, S.; HAHN, T.; WEISS, U.; KAUFMANN, P.; DESOYE, G. 2000. Endothelin A and B receptors change their expression levels during development of human placental villi. (Abstract). *Placenta* 21(5-6):536–546.

CLINI, E.; AMBROSINO, N. 2002. Nitric oxide and pulmonary circulation. *Med Sci Monit.* 8(8):RA178-182.

COE, Y.; HALEEN, S.J.; WELCH, K.M.; LIU, Y.; COCEANI, F. 2002. The endothelin A receptor antagonists PD 156707 (CI-1020) and PD 180988 (CI-1034) reverse the hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perinatal lambs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(2):672-680.

DOMKOWSKI, P.W.; COCKERHAM, J.T.; KOT, P.A.; MYERS, J.L.; HOPKINS, R.A. 2000. Characterization of the pulmonary arterial response to endothelin-1 and bosentan in neonatal pigs. *Ann. Thorac. Surg.* 70(5):1522-1530.

DOUGLAS, S.A. 1997. Clinical development of endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 18(11):408-412.

DURMOWICZ, A.G.; HOFMEISTER, S.; KADYRALIEV, T.K.; ALDASHEV, A.A.; STENMARK, K.R. 1993. Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude. (Abstract). *J. Appl. Physiol.* 74(5):2276-2285.

EDDAHIBI, S.; RAFFESTIN, B.; BRAQUET, P.; CHABRIER, P.E.; ADNOT, S. 1991. Pulmonary vascular reactivity to endothelin-1 in normal and chronically pulmonary hypertensive rats. (Abstract). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17(Suppl 7):S358-S361.

EDDAHIBI, S.; ADNOT, S.; CARVILLE, C.; BLOUQUIT, Y.; RAFFESTIN, B. 1992. L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. (Abstract). *Am. J. Physiol.* 263(2 Pt 1):L194-L200.

FRATZ, S.; MEYRICH, B.; OVADIA, B.; JOHENGEN, M.J.; REINHARTZ, O.; AZAKIE, A.; ROSS, G.; FITZGERALD, R.; OISHI, P.; HESS, J.; BLACK, S.M.; FINEMAN, J.R. 2004. Chronic endothelin A receptor blockade in lambs with increased pulmonary blood flow and pressure. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287(3):L592-L597.

GALIÉ, N.; MANES, A.; BRANZI, A. 2004. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* 61(2):227-237.

GE, R.L.; KUBO, K.; KOBAYASHI, T.; SEKIGUCHI, M.; HONDA, T. 1998. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *Am. J. Physiol.* 274(5 Pt 2):H1792-H1799.

GHANAYEM, N.S.; GORDON, J.B. 2001. Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate. *Respir. Res.* 2(3):139-144.

GIAID, A.; YANAGISAWA, M.; LANGLEBEN, D.; MICHEL, R.P.; LEVY, R.; SHENNIB, H.; KIMURA, S.; MASAKI, T.; DUGUID, W.P.; STEWART, D.J. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 328(24):1732-1739.

GIUSSANI, D.A.; PHILIPS, P.S.; ANSTEE, S.; BARKER, D.J. 2001. Effects of altitude versus economic status on birth weight and body shape at birth. *Pediatr. Res.* 49(4):490-494.

GLANTZ, S.A. 1981. What determines a test's power? In: *Primer of biostatistics*. 3ª edición. McGraw-Hill Book Company. New York, USA. pp. 135-151.

GOERRE, S.; WENK, M.; BÄRTSCH, P.; LÜSCHER, T.F.; NIROOMAND, F.; HOHENHAUS, E.; OELZ, O.; REINHART, W.H. 1995. Endothelin-1 in pulmonary hypertension associated with high-altitude exposure. *Circulation* 91(2):359-364.

GUYTON, A.; HALL, J. 2001. Circulación pulmonar; edema pulmonar; líquido pleural. In: Guyton, A.; Hall, J. *Tratado de fisiología médica*. 10ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. México, D.F., México. pp. 539-547.

HAMPL, V.; HERGET, J. 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev.* 80(4):1337-1372.

HARRIS, P.; HEATH, D.; SMITH, P.; WILLIAMS, D.R.; RAMÍREZ, A.; KRÜGER, H.; JONES, D.M. 1982. Pulmonary circulation of the llama at high and low altitudes. *Thorax* 37(1):38-45.

HASHIDO, K.; GAMOU, T.; ADACHI, M. 1992 Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ET-A receptor abrogated the binding activity to ET-1. (Abstract). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 187(3):1241–1248.

HEATH, D.; CASTILLO, Y.; ARIAS-STELLA, J.; HARRIS, P. 1969. The small pulmonary arteries of the llama and other domestic animals native to high altitudes. *Cardiovasc. Res.* 3(1):75-78.

HEATH, D.; SMITH, P.; WILLIAMS, D.; HARRIS, P.; ARIAS-STELLA, J.; KRÜGER, H. 1974. The heart and pulmonary vasculature of the llama (*Lama glama*). *Thorax* 29(4):463-471

HERRERA, E.A.; PULGAR, V.M.; RIQUELME, R.A.; SANHUEZA, E.M.; REYES, V.R.; EBENSPERGER, G.; HANSON, M.A.; GIUSSANI, D.A.; BLANCO, C.E.; LLANOS, A.J. 2004a. Chronic hypoxia modifies the cardiovascular function and the arterial contractility in the neonatal sheep. *Pediatr. Res.* 55:36.

HERRERA, E.A.; RIQUELME, R.A.; SANHUEZA, E.M.; PULGAR, V.M.; REYES, V.R.; EBENSPERGER, G.; EBENSPERGER, R.; PARER, J.T.; GIUSSANI, D.A.; BLANCO, C.E.; HANSON, M.A.; LLANOS, A.J. 2004b. Cardiovascular responses to acute hypoxemia in highland and lowland newborn llamas. In: 31st Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. Tuscany, Italy. 11-15th September 2004. pp. 60.

HERRERA, E.A.; PULGAR, V.M.; RIQUELME, R.A.; SANHUEZA, E.M.; REYES, V.R.; EBENSPERGER, G.; PARER, J.T.; VALDEZ, E.A.; GIUSSANI, D.A.; BLANCO, C.E.; HANSON, M.A.; LLANOS, A.J. 2007a. High altitude chronic

hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292(6):R2234-R2240.

HERRERA, E.A.; REYES, V.R.; GIUSSANI, D.A.; RIQUELME, R.A.; SANHUEZA, E.M.; EBENSPERGER, G.; CASANELLO, P.; MÉNDEZ, N.; EBENSPERGER, R.; SEPÚLVEDA-KATTAN, E.; PULGAR, V.M.; CABELLO, G.; BLANCO, C.E.; HANSON, M.A.; PARER, J.T.; LLANOS, A.J. 2007b. Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc. Res.*77(1):197-201.

HEYMANN, M.A. 1999. Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 84(2):127-132.

HORSTMAYER, A.; CRAMER, H.; SAUER, T.; MÜLLER-ESTERL, W.; SCHROEDER, C. 1996. Palmitoylation of endothelin receptor A. (Abstract). *J. Biol. Chem.* 271(34):20811–20819.

HU, J.; DISCHER, D.J.; BISHOPRIC, N.H.; WEBSTER, K.A. 1998. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(3):894-899.

HÜRLIMANN, D.; RUSCHITZKA, F.; LÜSCHER, T.F. 2002. The relationship between the endothelium and the vessel wall. *Eur Heart J. Suppl.* 4(SupplA):A1-A7.

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. COMMISSION ON LIFE SCIENCES. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NATIONAL ACADEMY PRESS. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Guiding principles for research involving animals and human being of the American Physiological Society.

[en línea] Washington, USA <<http://newton.nap.edu/html/labrats>> [consulta: 24-03-2008].

IVY, D.D.; KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. 1994. Physiologic characterization of endothelin A and B receptor activity in the ovine fetal pulmonary circulation. *J. Clin. Invest.* 93(5): 2141-2148.

IVY, D.D.; KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. 1996a. Endothelin blockade augments pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *J. Appl. Physiol.* 81(6):2481-2487.

IVY, D.D.; ZIEGLER, J.W.; DUBUS, M.F.; FOX, J.J.; KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. 1996b. Chronic intrauterine pulmonary hypertension alters endothelin receptor activity in the ovine fetal lung. *Pediatr. Res.* 39(3):435-442.

IVY, D.D.; PARKER, T.A.; ZIEGLER, J.W.; GALAN, H.L.; KINSELLA, J.P.; TUDER, R.M. 1997. Prolonged endothelin A receptor blockade attenuates chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *J. Clin. Invest.* 99(6):1179-1186.

IVY, D.D.; LE CRAS, T.D.; HORAN, M.P.; ABMAN, S.H. 1998. Increased lung preproET-1 and decreased ET_B-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 274(4 Pt 1) (Lung Cell. Mol. Physiol.18):L535-L541.

IVY, D.D.; LE CRAS, T.D.; PARKER, T.A.; ZENGE, J.P.; JAKKULA, M.; MARKHAM, N.E.; KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. 2000a. Developmental changes in endothelin expression and activity in the ovine fetal lung. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 278(4):L785-L793.

IVY, D.D.; PARKER, T.A.; ABMAN, S.H. 2000b. Prolonged endothelin B receptor blockade causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279(4):L758-L765.

KALINA, B.; LÖFFLER, B.M. 1992. Crosslinking analysis of an endothelin receptor protein from human placenta. (Abstract). *Biochem. Intern.* 27(4):735–744.

KANAZAWA, F.; NAKANISHI, K.; OSADA, H.; KANAMARU, Y.; OHRUI, N.; UENOYAMA, M.; MASAKI, Y.; KANATANI, Y.; HIROI, S.; TOMINAGA, S.; YAKATA-SUZUKI.; MATSUYAMA, S.; KAWAI, T. 2005. Expression of endothelin-1 in the brain and lung of rats exposed to permanent hypobaric hypoxia. *Brain Res.* 1036(1-2):145-154.

KEDZIERSKI, R.M.; YANAGISAWA, M. 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:851-876.

KISERUD, T.; ACHARYA, G. 2004. The fetal circulation. *Prenat. Diagn* 24(13):1049-1059.

KUMAR, P.; KAZZI, N.J.; SHANKARAN, S. 1996. Plasma immunoreactive endothelin-1 concentrations in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. (Abstract). *Am. J. Perinatol.* 13(6):335-341.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (Abstract). *Nature.* 227(5259):680-685.

LI, H.; CHEN, S.J.; CHEN, Y.F.; MENG, O.C.; DURAND, J.; OPARIL, S.; ELTON, T.S. 1994. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. (Abstract). *J. Appl. Physiol.* 77(3):1451-1459.

LLANOS, A.J.; RIQUELME, R.A.; SANHUEZA, E.M.; HANSON, M.A.; BLANCO, C.E.; PARER, J.T.; HERRERA, E.A.; PULGAR, V.M.; REYES, V.R.; CABELLO, G.; GIUSSANI; D.A. 2003. The fetal llama versus the fetal sheep: different strategies to withstand hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 4(2):193-202.

MacLEAN, M.R.; McCULLOCH, K.M.; BAIRD, M. 1995. Effects of pulmonary hypertension on vasoconstrictor responses to endothelin-1 and sarafotoxin S6C and on inherent tone in rat pulmonary arteries. (Abstract). J. Cardiovasc. Pharmacol. 26(5):822-830.

MacLEAN, M.R. 1998. Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension? Pulm. Pharmacol. Ther. 11(2-3):125-132.

MacLEAN, M.R.; DOCHERTY, C.C.; McCULLOCH, K.M.; MORECROFT, I. 1998. Effect of novel mixed ETA/ETB antagonists on responses to ET-1 in human small muscular pulmonary arteries. Pulm. Pharmacol. Ther. 11(2-3):147-149.

MAGGIORINI, M.; LEÓN-VELARDE, F. 2003. High-altitude pulmonary hypertension: a pathophysiological entity to different diseases. Eur. Respir. J. 22(6):1019-1025.

MASAKI, T.; MIWA, S.; SAWAMURA, T.; NINOMIYA, H.; OKAMOTO, Y. 1999. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. Eur. J. Pharmacol. 375(1-3):133-138.

McMURTRY, I.F.; PETRUN, M.D.; REEVES, J.T. 1978. Lungs from chronically hypoxic rats have decreased pressor response to acute hypoxia. (Abstract). Am. J. Physiol. 235(1):H104-109.

MICHIELS, C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. Am J Pathol. 164(6):1875-1882.

MOORE, L. 2001. Human genetic adaptation to high altitude. High Alt. Med. Biol. 2(2):257-279.

MORGANTI, A.; GIUSSANI, M.; SALA, C.; GAZZANO, G.; MARANA, I.; PIERINI, A.; SAVOIA, M.T.; GHIO, F.; COGO, A.; ZANCHETTI, A. 1995. Effects of exposure to high altitude on plasma endothelin-1 levels in normal subjects. (Abstract). *J. Hypertens.* 13(8):859-865.

NAKANISHI, K.; TAJIMA, F.; NAKATA, Y.; OSADA, H.; TACHIBANA, S.; KAWAI, T.; TORIKATA, C.; SUGA, T.; TAKISHIMA, K.; AURUES, T.; IKEDA, T. 1999. Expression of endothelin-1 in rats developing hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. (Abstract). *Lab. Invest.* 79(11):1347-1357.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. .Entrez Nucleotide. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>> [consulta: 24-03-2008].

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. .Entrez Protein. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Protein>> [consulta: 24-03-2008].

NIERMEYER, S. 2003. Cardiopulmonary transition in the high altitude infant. *High Alt. Med. Biol.* 4(2):225-239.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R BRUZZONE, M.E.; BEHN, C.; RAGGI, L.A. 2005. Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17(5):497-505.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; CEPEDA, R.; GONZÁLEZ, C.; DE LOS REYES, M.; BRUZZONE, M.E.; BEHN, C.; RAGGI, L.A. 2006. Ovine placenta at high altitudes: comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Anim. Reprod.* 95(1-2):151-157.

PEÑALOZA, D.; SIME, F.; BANCHERO, N.; GAMBOA, R.; CRUZ, J.; MARTICORENA, E. 1963. Pulmonary hypertension in healthy men born and living at high altitudes. *Am. J. Cardiol.* 11:150-157.

PERREAULT, P.; COCEANI, F. 2003. Endothelin in the perinatal circulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81(6):644-653.

PERREAULT, T. 2006 Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Paediatr Respir Rev.* 7(Suppl 1):S175-176.

PORCELLI, R.J.; BERGMAN, M.J. 1983. Effects of chronic hypoxia on pulmonary vascular responses to biogenic amines. (Abstract). *J. Appl. Physiol.* 55(2):534-540.

PRIONICS®-CHECK. Manual del kit de ensayo para determinación de la proteína priónica específica de la enfermedad, en ganado bovino y ovino. Prionics AG, Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstr. 190, CH-8057 Zürich, Switzerland. [actualmente el manual no se encuentra en línea] <www.prionics.com> [consulta: 24-03-2008].

RAGGI, L.A.; FERRANDO, G. 1998. Avances en fisiología y adaptación de camélidos sudamericanos. *Av. Ciencias Vet.* 13 (1): 3 - 15.

RHODES, J. 2005. Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J Appl Physiol.* 98(3):1092-1100.

RUBANYI, G.M.; BOTELHO, L.H. 1991. Endothelins. *FASEB J.* 5(12):2713-2720.

RUI, L.; CAI, Y. 1991. Effect of chronic hypoxia on endothelium-dependent relaxation and cGMP content in rat pulmonary artery. (Abstract). *Chin. Med. Sci. J.* 6(3):145-147.

RUSSELL, F.D.; DAVENPORT, A.P. 1999. Secretory pathways in endothelin

synthesis. *Br J Pharmacol.* 126(2):391-398.

SAKAI, A.; MATSUMOTO, T.; SAITOH, M.; MATSUZAKI, T.; KOIZUMI, T.; ISHIZAKI, T.; RUAN, Z.H.; WANG, Z.G.; CHEN, Q.H.; WANG, X.Q. 2003. Cardiopulmonary hemodynamics of blue-sheep, *Pseudois nayaur*, as high-altitude adapted mammals. *Jpn. J. Physiol.* 53(5):377-384.

SATOH, M.; MIYAMOTO, C.; TERASHIMA, H. 1997. Human endothelin receptors ETA and ETB expressed in baculovirus-infected insect cells. Direct application for signal transduction analysis. (Abstract). *Eur. J. Biochem.* 249(3):803–811.

SAUVAGEAU, S.; THORIN, E.; CARON, A.; DUPUIS, J. 2007. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *J. Vasc. Res.* 44(5):375-381.

SCHOFIELD, C.J.; RATCLIFFE, P.J. 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5(5):343-354.

SEMENZA, G.L. 2000. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir.* 1(3):159-162.

SEMENZA, G.L. 2004. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J. Appl. Physiol.* 96(3):1173-1177.

SEMENZA, G.L. 2005. Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2(1):68-70.

SHIMODA, L.A.; SHAM, J.S.K.; SYLVESTER, J.T. 2000. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiol. Res.* 49(5):549-560.

SHIMODA, L.A.; SHAM, J.S.K.; LIU, Q.; SYLVESTER, J.T. 2002. Acute and

chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1?.
Respir. Physiol. Neurobiol. 132(1):93-106.

SIME, F.; BANCHERO, N.; PEÑALOZA, D.; GAMBOA, R.; CRUZ, J.; MARTICORENA, E. 1963. Pulmonary hypertension in children born and living at high altitudes. *Am. J. Cardiol.* 11(2):143-149.

STANLEY, H.F.; KADWELL, M.; WHEELER, J.C. 1994. Molecular evolution of the family *Camelidae*: a mitochondrial DNA study. *Proc. Biol. Sci.* 256(1345):1-6.

SUGUIHARA, C. 2001. Treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J. Pediatr. (Rio J)* 77(Supl.1):S17-S24.

TAKASUKA, T.; ADACHI, M.; MIYAMOTO, C.; FURUCHUI, Y.; WATANABE, T. 1992. Characterization of endothelin receptors ETA and ETB expressed in COS cells. (Abstract). *J. Biochem.* 112(3):396-400.

TAKASUKA, T.; SAKURAI, T.; GOTO, K.; FURUCHUI, Y.; WATANABE, T. 1994. Human endothelin receptor ETB. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand. (Abstract). *J. Biol. Chem.* 269(10):7509-7513.

TEITEL, D.; HEYMANN, M. 1988. Alteraciones cardiovasculares en el período neonatal. **In:** Sola, A.; Urman, J. *Cuidados intensivos neonatales: fisiopatología y terapéutica.* 3ª edición. Editorial Científica Interamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 257-292.

THE EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE AND GENOME RESEARCH LIMITED. Ensembl. [en línea] <<http://www.ensembl.org/index.html>>. [consulta: 24-03-2008].

TOWBIN, H.; GORDON, J. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding-current

status and outlook. (Abstract). *J. Immunol. Methods.* 72(2):313-340.

ULRICH, S.; FISCHLER, M.; SPEICH, R. 2007. Update on therapies for pulmonary hypertension. *Swiss. Med. Wkly.* 137(5-6):73-82.

UNITED KINGDOM. 1986. Presented to Parliament by the Secretary of State for the Home Department pursuant to Act Eliz. II 1986. Guidance on the operation of the animals Capítulo 14 Section 21 (Animals (Scientific Procedures) Act 1986. [en línea]. <<http://www.archive.official-documents.co.uk/document/hoc/321/321.htm>>. [consulta: 24-03-2008].

UNIVERSIDAD DE HEIDELBERG. 2007. Molekularbiologische untersuchungen.. Nachweis von RNA-sequenzen. Amplifikation. RT-PCR. Imagen. [en línea]. <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/molekularbiologie/rt-pcr.jpg>. [consulta: 24-03-2008].

WANSTALL, J.C.; O'DONNELL, S.R. 1990. Endothelin and 5-hydroxytryptamine on rat pulmonary artery in pulmonary hypertension. (Abstract). *Eur. J. Pharmacol.* 176(2):159-168.

WEISSMANN, N.; GRIMMINGER, F.; OLSCHESKI, A.; SEEGER, W. 2001. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281(2):L314-L317.

WENDEL, M.; KUMMER, W.; KNELS, L.; SCHMECK, J.; KOCH, T. 2005. Muscular ETB receptors develop postnatally and are differentially distributed in specific segments of the rat vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 53(2):187-196.

WITTBRODT, E.T.; ABUBAKAR, A. 2007. Sitaxsentan for treatment of pulmonary hipertensión. *Ann. Pharmacother.* 41(1):100-105.

WOJCIAK-STOTHARD, B.; HAWORTH, S.G. 2006. Perinatal changes in pulmonary vascular endothelial function. *Pharmacol Ther.* 109(1-2):78-91.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K; MASAKI, T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163):411-415.