



---

# **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

TRABAJO FIN DE MÁSTER

## **Dimorfismo sexual en un modelo de hipertensión pulmonar en rata**

Presentado por

**María Moral Alonso**

Dirigido por

**Dra. Asunción Rocher Martín**

**Dra. Elena Olea Fraile**



## INDICE

	<b>Páginas</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hipertensión arterial pulmonar</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hipoxia crónica (modelo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica) como causa de la HAP</b>	<b>2</b>
1.2.1 Efectos de la Hipoxia a nivel sistémico: Adaptaciones y mal adaptaciones	<b>2</b>
1.2.2 Efectos patológicos a nivel vascular	<b>3</b>
<b>1.3 Dimorfismo sexual en la hipertensión pulmonar</b>	<b>5</b>
1.3.1 Efecto hormonal en la HAP	<b>6</b>
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Animales de experimentación</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Técnicas quirúrgicas</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Registro de Presiones: sistémica (PAS) y pulmonar (PAP)</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Contractibilidad de la arteria pulmonar medida por Miografía de alambre</b>	<b>12</b>
<b>3.5 Expresión de eNOS en arteria pulmonar mediante Western Blot</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Determinación de nitritos en plasma</b>	<b>14</b>
<b>3.7 Medición de arginina/ADMA</b>	<b>14</b>
<b>3.8 Análisis de datos</b>	<b>14</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Variación en el peso</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Hematocrito</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Medida de presión arterial</b>	<b>16</b>
4.3.1 Presión arterial sistémica y pulmonar	<b>16</b>
4.3.2 Medida de la vasoconstricción pulmonar hipóxica	<b>17</b>
<b>4.4 Parámetros cardiacos</b>	<b>18</b>
<b>4.5 Propiedades contráctiles de las arterias pulmonares: efecto del 17β-estradiol</b>	<b>19</b>
<b>4.6 Expresión de eNOS en arteria pulmonar</b>	<b>21</b>
<b>4.7 Medida de nitritos, L-arginina y ADMA en plasma</b>	<b>22</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>



## ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticuerpo
<b>ADMA</b>	Dimetilarginina asimétrica
<b>BMPR2</b>	Receptor de la Proteína Morfo-genética Ósea tipo II
<b>CC</b>	Cuerpo Carotídeo
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor Estrogénico alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor Estrogénico beta
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FC</b>	Frecuencia cardiaca
<b>HAP</b>	Hipertensión arterial pulmonar
<b>HC</b>	Hipoxia crónica
<b>HCT</b>	Hematocrito
<b>HIF-1</b>	Factor Inducible por Hipoxia 1
<b>HPPRN</b>	Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa
<b>NTS</b>	Núcleo del Tracto Solitario
<b>PAP</b>	Presión arterial pulmonar
<b>PAS</b>	Presión arterial sistémica
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>RVP</b>	Resistencia Vascular Pulmonar
<b>VD</b>	Ventrículo Derecho
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo
<b>VPH</b>	Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica

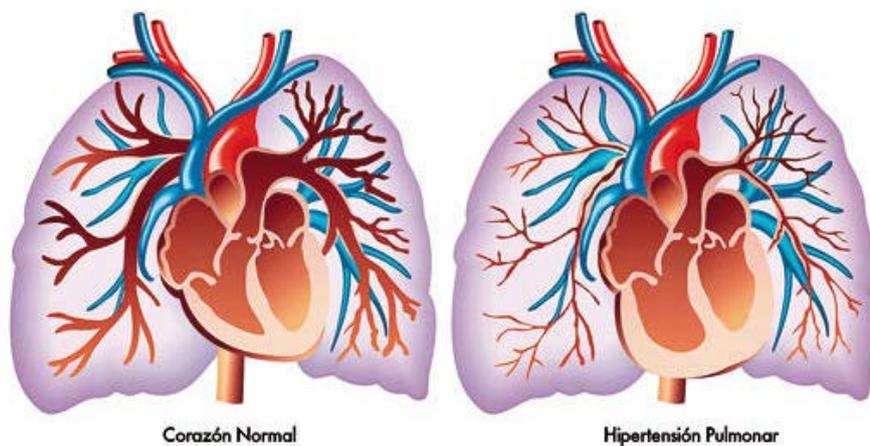


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Hipertensión arterial pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) se caracteriza por el aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar (RVP) que conduce al fallo del ventrículo derecho y puede llegar a provocar la muerte prematura<sup>1</sup>; se considera hipertensión cuando la presión media en la arteria pulmonar es igual o superior a 25mmHg en reposo. Puede estar ocasionada por múltiples patologías como la enfermedad veno-oclusiva pulmonar, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (HPPRN), cardiopatía izquierda o trastornos pulmonares que producen hipoxemia, causa en la que va a estar centrado este trabajo. Entre otros factores que pueden ocasionar esta enfermedad podemos encontrar también la predisposición genética (mutación en el gen que afecta la expresión del receptor BMPR2), la inducción por fármacos o asociada a otras patologías que obstruyen la microcirculación pulmonar como trastornos del tejido conectivo, VIH, hipertensión portal o cardiopatías congénitas<sup>2</sup>.

El aumento de RVP en la HAP está originada por una vasoconstricción arterial pulmonar patológica junto con un aumento en el tamaño de la pared vascular, que a su vez provoca un engrosamiento del ventrículo derecho (VD), tal y como se muestra en la figura 1 (ref.3). Este remodelado vascular se produce por una proliferación del endotelio y de células musculares lisas causando hipertrofia e inflamación crónica. La vasoconstricción es debida a un aumento en la actividad del tromboxano y de la endotelina-1 (agentes vasoconstrictores) y a una disminución en la actividad de la prostaciclina y el óxido nítrico (agentes vasodilatadores)<sup>1</sup>. Este aumento de la presión vascular pulmonar lesiona el endotelio, activando la coagulación en la capa íntima de la pared vascular y empeorando de este modo la hipertensión.



**Figura 1. Comparación del sistema circulatorio pulmonar normal y con hipertensión arterial pulmonar.** En la HAP se observa vasoconstricción de las arterias pulmonares y aumento del VD junto con engrosamiento de la pared ventricular (Tomada de Ref.3).

En una persona que sufre esta patología se puede observar disnea y fatiga ante mínimos esfuerzos que puede ser progresiva con el ejercicio y ocasionar mareos; también puede producir malestar atípico en el pecho. Estos síntomas se deben en gran parte a un insuficiente gasto cardíaco originado por la insuficiencia cardíaca derecha. En la enfermedad avanzada se observa insuficiencia tricuspídea y distensión

de la vena yugular, congestión hepática y de forma tardía, se puede manifestar edema periférico<sup>1</sup>.

La HAP no tiene cura. Como tratamiento de la HAP se pautan fármacos como *epoprostenol*, una prostaglandina inhibidora de la agregación plaquetaria que estimula la adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMPc; otros fármacos utilizados son análogos de prostaciclina, antagonistas de endotelina e inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5). Como tratamiento complementario se recomienda la terapia con oxígeno y el uso de diuréticos y anticoagulantes además de evitar actividades que pueda exacerbar la enfermedad (como el tabaquismo). El *epoprostenol IV* es el tratamiento más eficaz para tratar la HAP ya que mejora la función vasodilatadora de la prostaciclina y la supervivencia de los pacientes; sin embargo, presenta desventajas como la necesidad de infusión continua por un catéter central con riesgo de bacteriemia, eritema facial y diarrea, además de requerir supervisión en unidades hospitalarias especializadas.

El pronóstico de esta patología presenta una mortalidad del 10 al 30% a los 3 años de su diagnóstico, aunque esta probabilidad puede variar en función de la efectividad de los tratamientos mencionados anteriormente. La HAP afecta a pacientes jóvenes con una edad promedio de 36 años (>50% con 15 años, 25% con 60 años y 10% con 70 años o más). La prevalencia que presenta esta patología es de 15 casos por millón de habitantes, mostrando una incidencia de 2,4 casos por millón de habitantes adultos en un año<sup>4</sup>.

## **1.2 Hipoxia crónica (modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica) como causa de la HAP**

Como se ha comentado anteriormente, una de las causas que puede ocasionar HAP son los trastornos pulmonares que producen hipoxemia. Estos trastornos incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad pulmonar intersticial, los trastornos respiratorios del sueño, síndrome de apnea/hipoventilación, exposición crónica a grandes alturas o anomalías del desarrollo. En los estudios realizados en pacientes con EPOC severa se ha observado una incidencia del 86% de HAP leve a moderada y un porcentaje de 5% de HAP severa, presentando una hipoxemia grave sin hipercapnia<sup>4</sup>.

Este trabajo se va a centrar en un modelo de HAP producido por la exposición de animales de laboratorio a hipoxia crónica mantenida. Se ha descrito que la hipoxia crónica provoca una hiperplasia en la musculatura de las arterias pulmonares, producida por una disfunción endotelial y por una proliferación de las células del músculo liso vascular, causando un remodelado vascular<sup>5,6</sup>. Junto con estos cambios, se observa una pérdida de peso corporal<sup>5,7</sup>. Estos cambios se ven influidos por el tipo de especie animal, el sexo y el tipo de situación que provoque la hipoxia<sup>8</sup>. El tabaco, como factor de riesgo añadido a la hipoxia, exacerba el curso y la gravedad de la HAP, observándose un aumento de las resistencias vasculares<sup>9</sup>. Se desconocen los mecanismos patológicos completos que originan este remodelado vascular, pero parecen encontrarse tanto a nivel vascular como a nivel sanguíneo.

### **1.2.1 Efectos de la Hipoxia a nivel sistémico: adaptaciones y mal adaptaciones**

La exposición a hipoxia supone un estímulo fisiológico fundamental que genera en el organismo una serie de cambios adaptativos; estos cambios están producidos en gran parte por un sistema compensatorio que actúa como factor regulador de la homeostasis del oxígeno, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). HIF-1 es un factor de transcripción que en ausencia de oxígeno es fosforilado, estabilizado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 $\beta$ , permitiendo la transactivación e inducción de

genes con elementos de respuesta a hipoxia en su promotor<sup>10</sup>. Estas respuestas adaptativas frente a la hipoxia se manifiestan en cambios metabólicos, cambios de mediadores celulares y de actividad enzimática a través de las variaciones en la expresión de una serie de genes. Entre estos ajustes destaca el aumento de eritropoyetina (EPO)<sup>11</sup> y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)<sup>12</sup>, así como muchos enzimas implicados en el metabolismo anaerobio glicolítico.

El aumento de EPO se produce a nivel renal por la propia hipoxia y por el incremento en la secreción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales. La EPO activa la eritropoyesis aumentando el número de eritrocitos, y por lo tanto de hemoglobina, aumentando la capacidad del transporte de O<sub>2</sub> en sangre. Mediante el VEGF se estimula la angiogénesis facilitando la irrigación y oxigenación de las zonas hipóxicas<sup>8,13</sup>.

Sin embargo, la eritropoyesis promovida por la HC produce policitemia sanguínea. El aumento del hematocrito, debido al aumento del volumen celular respecto al volumen de plasma, produce una mayor viscosidad de la sangre que junto con el remodelado vascular pulmonar genera hipertrofia del VD al aumentar el trabajo requerido para mantener el gasto cardíaco.

La hipoxia, a través de HIF-1, se relaciona con la estimulación de la síntesis de endotelina-1 (ET-1) en el endotelio, induciendo vasoconstricción y ocasionando la disminución de la luz de los vasos que se encuentran en zonas menos oxigenadas del pulmón, mecanismo conocido como vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), la cual favorece la redistribución de flujo sanguíneo hacia las zonas pulmonares mejor oxigenadas<sup>10</sup>. La vasoconstricción generada por la disfunción endotelial, la hipertrofia de la capa media y adventicia junto con la angiogénesis producida por VEGF, generan un remodelado vascular patológico en la circulación pulmonar<sup>10</sup> (figura 1). La vasoconstricción persistente junto con la remodelación vascular conlleva a un estrechamiento de la luz arterial que reduce el área vascular pulmonar promoviendo el desarrollo de la HAP<sup>14,15</sup>.

La hipoxia produce de forma rápida y refleja ajustes ventilatorios mediados por los quimiorreceptores arteriales, mayoritariamente por el cuerpo carotídeo (CC). El CC es un pequeño órgano sensorial del sistema nervioso periférico que está situado en la bifurcación de la arteria carótida común. Este órgano con inervación aferente sensorial procedente del glosofaríngeo, es capaz de detectar cambios en los niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y en el pH sanguíneo a través de sus células tipo I. La activación de dichas células por estos estímulos y su transducción promueve la secreción de neurotransmisores que activan a las fibras aferentes de nervio del seno carotídeo conduciendo la señal hasta el núcleo del tracto solitario (NTS) en el bulbo raquídeo, promoviendo respuestas reflejas en los sistemas respiratorio (hiperventilación) y cardiovascular (mediado por SN simpático)<sup>16</sup>. A largo plazo la hipoxia mantenida produce una aclimatación respiratoria caracterizada por un aumento progresivo de la ventilación basal y de la respuesta ventilatoria a la hipoxia aguda, efectos mediados por la estimulación continuada del CC.

### **1.2.2 Efectos patológicos a nivel vascular**

Las arterias, tal y como se muestra en la figura 2 (*ref.17*), están formadas por tres capas principales, la capa adventicia, parte externa del vaso formada por fibras de colágeno, la capa media, parte donde se encuentran las células del músculo liso vascular, y la capa íntima, parte que contacta con la sangre donde se encuentran las células endoteliales. En situación de HC, en la capa adventicia se observa un engrosamiento causado por una acumulación de fibroblastos y miofibroblastos junto con un aumento de colágeno, elastina, fibronectina y tenascina en la matriz extracelular. En la capa media también se observa hipertrofia con aumento de células

del músculo liso vascular junto con la acumulación de colágeno y elastina en la matriz extracelular. En las células endoteliales, correspondiendo a la capa íntima, se observa mayor presencia de laminina y fibronectina; esta es la zona del vaso donde se produce mayor variabilidad ya que aparte de existir cambios a nivel estructural también se generan importantes cambios a nivel metabólico<sup>8,18</sup>.

En condiciones normales, el metabolismo del endotelio participa directamente en el tono y contractibilidad vascular. Tal y como se muestra en la figura 3 (ref.19), la óxido nítrico sintasa (NOS) está estimulada por la activación del receptor muscarínico de acetilcolina (M); también se estimula, en la propia célula endotelial, mediante la activación del receptor ET<sub>B</sub> por ET-1.

La NOS cataliza la síntesis de NO a partir de L-arginina:



El NO difunde a la célula muscular vascular estimulando la guanilciclase (GC) que a su vez aumenta la síntesis de GMPc, un vasodilatador arterial. Las prostaglandinas PGI<sub>2</sub> también intervienen en la vasodilatación a través del AMPc, aunque la presencia de ET-1 produce vasoconstricción<sup>19</sup>.

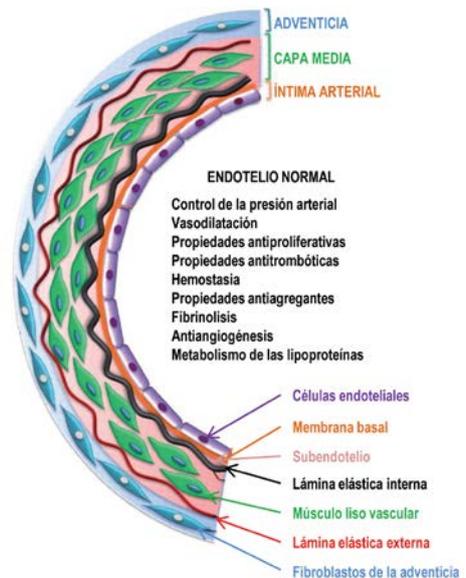


Figura 2. Composición de una arteria

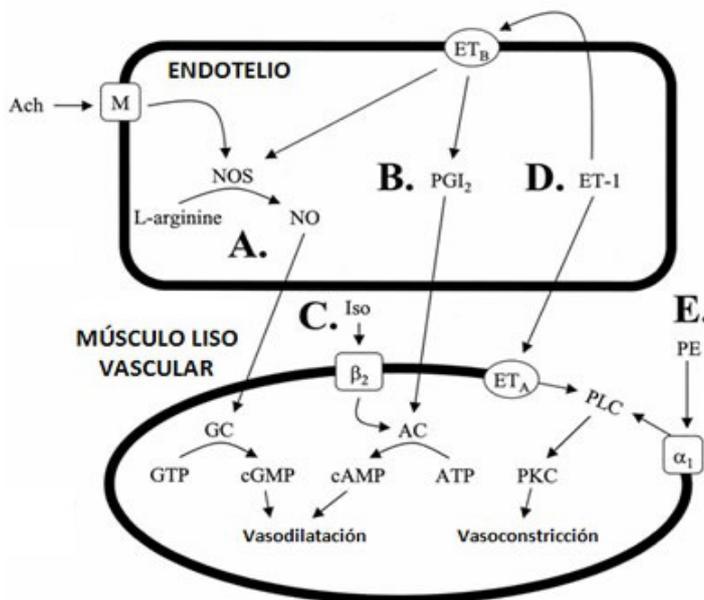


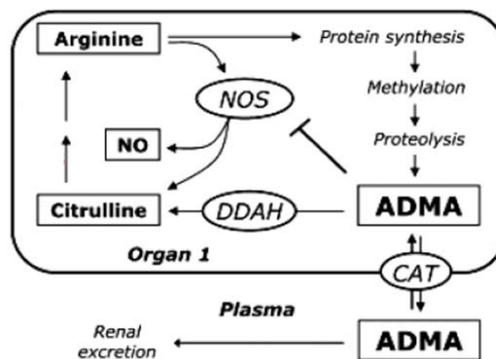
Figura 3. Papel del endotelio en el tono vascular.

**A:** La acetilcolina (Ach) se une al receptor muscarínico estimulando la NOS que a partir de L-arginina activa la síntesis de NO, la estimulación de la guanilciclase (GC) en el músculo liso vascular aumentando el GMPc.  
**B:** Prostaglandina-12 (PGI<sub>2</sub>) estimula la adenilciclase (AC) en el músculo liso para producir AMPc. **C:** La activación del R β<sub>2</sub> adrenérgico también estimula AC. GMPc y AMPc producen vasodilatación. **D:** La endotelina 1 (ET-1) se une al receptor ET<sub>A</sub>, activando la fosfolipasa C (PLC) y la proteincinasa C (PKC), produciendo vasoconstricción. La ET-1 media a través del receptor ET<sub>B</sub> la producción de NOS y PGI<sub>2</sub>. **E:** La activación del receptor α<sub>1</sub>-adrenérgico (PE, fenilefrina), activa la PLC. (Tomado de ref. 15).

En situación de HC, en las células endoteliales se observa cambios en la expresión de eNOS. Una disminución de NO, junto con una menor concentración de PGI<sub>2</sub>, así como un aumento de ET-1 provoca una disminución en la relajación de los vasos, dependiente del endotelio<sup>20</sup>. Esto influye en la deposición anormal de colágeno y elastina en la túnica adventicia y en una hipertrofia del músculo liso en la túnica media. También se observa un aumento en la expresión de factores de crecimiento y marcadores de inflamación, influyendo estos factores en el metabolismo endotelial y en la proliferación del músculo liso<sup>8,14,11</sup>.

El grado de disminución del NO puede verse alterado tanto por la edad como por el sexo; a medida que se eleva la edad hay un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en los vasos, ocasionando una disminución en los niveles de NO. A nivel hormonal, las fluctuaciones en la concentración de hormonas pueden influir en la regulación post-transcripcional y/o translacional de la proteína NOS, produciendo una disminución en los niveles de NO en plasma<sup>5,7,8</sup>.

La arginina, sustrato de la reacción, procede del medio extracelular o de la proteólisis intracelular. Algunos residuos de arginina de las proteínas pueden ser patológicamente metiladas por estrógenos con actividad arginin-metiltransferasas, generando análogos metilados de L-arginina. El más potente es el ADMA (asymmetricdimethyl-arginine) que tiene la capacidad de inhibir competitivamente la NOS, disminuyendo la capacidad de vasodilatación en el vaso (figura 4; ref. 16).



**Figura 4.** Señalización endotelial por L-arginina y efecto de sus metabolitos inhibidores (ADMA) sobre la NOS.

### 1.3 Dimorfismo sexual en la Hipertensión Pulmonar

El género y las hormonas sexuales influyen en el desarrollo de la enfermedad vascular pulmonar y en el pronóstico de ésta. La HAP es casi dos veces más frecuente en mujeres que en hombres, presentando un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad; por el contrario, en mujeres se observa una mejor evolución en las funciones del ventrículo derecho y una tasa de supervivencia superior en comparación con los hombres; a este hecho se le conoce como “efecto paradójico de los estrógenos”. Se ha demostrado que los estrógenos, mejoran la vasculopatía pulmonar y las funciones del ventrículo derecho en modelos animales de HAP; esto parece deberse a su participación en la función vascular regulando la señalización y el metabolismo de las células endoteliales y/o musculares. Los estrógenos también pueden participar en la señalización que regula la inflamación y las funciones inmunes, pudiendo influir de este modo en la evolución de la enfermedad vascular pulmonar.

En un estudio realizado en 2014<sup>21</sup> en el que se comparan mujeres y hombres con HAP, se ha observado que los hombres a largo plazo presentan una presión en aurícula derecha más elevada, mayor hipertensión pulmonar, mayor resistencia vascular pulmonar y una disminución del gasto cardiaco en comparación con las mujeres. Se ha constatado un aumento de riesgo en hombres, disminuyendo la tasa de supervivencia en edad avanzada. Esta diferencia ligada al sexo cambia a partir de los 45 años, donde el riesgo vascular pulmonar se iguala entre hombres y mujeres, se observan los mismos parámetros tanto de presión pulmonar como de resistencia vascular pulmonar, correspondiendo al momento de la menopausia<sup>21,22</sup>.

La hiperplasia ventricular es la principal causa de muerte en pacientes con HAP, las rutas hormonales influyen en las funciones ventriculares y explican la observación de que se desarrolle antes la patología en mujeres pero que por el contrario, presenten mayor supervivencia que los hombres<sup>21</sup>.

En resumen, la frecuencia de HAP idiopática y heredable es mayor entre mujeres, en comparación con los hombres. En cambio, la mortalidad vinculada con la HAP es mayor en hombres<sup>23</sup>.

### 1.3.1 Efecto hormonal en la HAP

Tanto los estrógenos como los andrógenos son compuestos vasoactivos que pueden actuar a nivel pulmonar e influir sobre la proliferación celular y la apoptosis<sup>23</sup>. Los efectos de las hormonas en la HAP dependen de la concentración de oxígeno, la distribución de receptores y metabolismo de las hormonas.

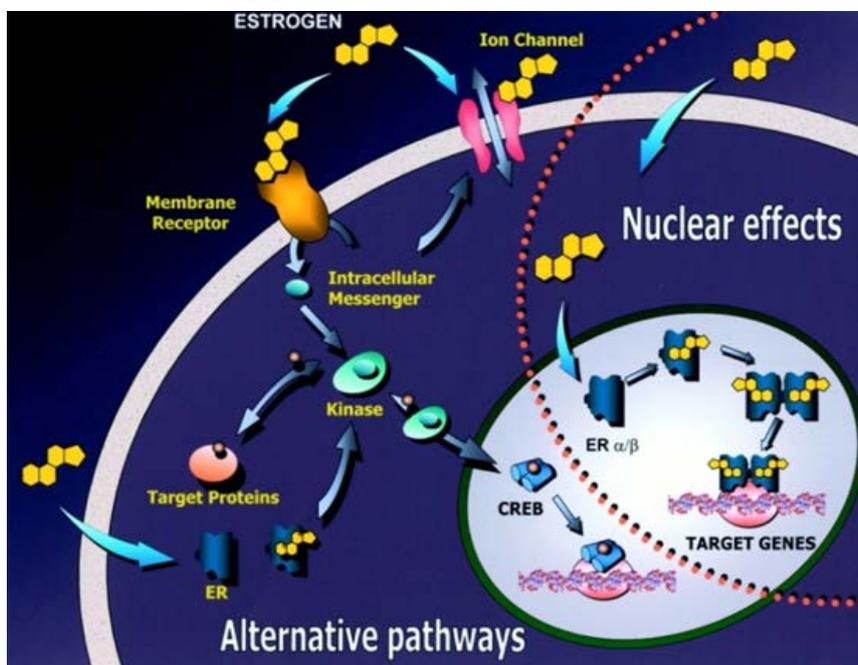
Existen rutas de señalización molecular dependiente de hormonas sexuales que pueden estar implicadas en la HAP: en concreto, las hormonas sexuales modulan la señalización del NO y la ruta de ET-1. Las mujeres presentan niveles más altos de NO, mientras que los hombres presentan niveles más elevados de ET-1 en sangre, por lo tanto mayor predominio de la vasoconstricción en hombres<sup>22</sup>.

El efecto paradójico de los estrógenos en la HAP está relacionado con diferentes mecanismos metabólicos entre receptores de señalización y su interacción con su sustrato específico<sup>23</sup>. Influye en esta alteración un cambio en la señalización del receptor de la proteína morfogenética ósea tipo II (BMP2), afectando estas modificaciones sobre la evolución del VD. El estradiol se une al receptor estrogénico alfa (ER $\alpha$ ) en la vasculatura pulmonar y se metaboliza mediante el citocromo P4501B1 en dos metabolitos principales: la 2-hidroxiestrone (2-OHE), relacionada con aumento del NO, PGI<sub>2</sub> y proliferación vascular y la 16 $\alpha$ -hidroxiestrone (16 $\alpha$ -OHE), relacionada con la inflamación y mitogénesis<sup>22</sup>. En función del metabolismo de los estrógenos, pueden generar un efecto u otro en la célula, llegando a tener un efecto genotóxico. Por tanto, la modificación del metabolismo de los estrógenos o un aumento de sus niveles, puede contribuir a la aparición de HAP en individuos con predisposición genética para padecer la enfermedad. Esta predisposición se ha vinculado con la mutación del gen que codifica para BMP2<sup>23</sup>.

BMP2 pertenece a la superfamilia de los ligandos TGF- $\beta$  y participa en la señalización paracrina. En la vasculatura pulmonar BMP2 está relacionado con la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular en respuesta a factores de crecimiento, favorece la supervivencia de las células endoteliales y previene el daño arterial ante respuestas inflamatorias. El gen BMP2 determina la sensibilidad a las hormonas esteroideas y favorece la señalización estrogénica facilitando la traslocación del complejo hormonal al núcleo. El promotor de BMP2 va unido al ER $\alpha$  modulando la acción de los estrógenos y sus receptores. La señalización estrogénica es vasodilatadora y antiinflamatoria, pero puede favorecer la HAP en presencia de la mutación del gen BMP2 al promover la resistencia a la insulina, la angiogénesis y la trombosis. Cuando se produce esta disfunción afecta a la señalización del estradiol en la vasculatura, causando proliferación del músculo liso vascular e hipertrofia del ventrículo derecho<sup>22</sup>. La mutación del BMP2, se asocia con la desregulación de la señalización del ER $\alpha$ , cambiando la ruta de señalización hacia la membrana en vez de hacia el núcleo, inhibiendo la señalización genómica y promoviendo un aumento de expresión de receptor estrogénico en la membrana celular<sup>23</sup>. Esta mutación, está presente en el 70-80% de las personas con HAP idiopática; se trata de una transmisión autosómica dominante con mayor predisposición en mujeres<sup>22</sup>. Todo ello sugiere una estrecha relación entre la alteración en el metabolismo del estradiol y la HAP.

Los receptores de estrógenos se clasifican en dos tipos, alfa (ER $\alpha$ ) y beta (ER $\beta$ ) y se encuentran en la membrana celular, en el citoplasma y en el núcleo. Están ubicados tanto en las células endoteliales como musculares lisas de la vasculatura sistémica, pero su distribución puede variar a nivel pulmonar dependiendo del contexto clínico del paciente. La expresión y actividad de estos receptores aumenta por la presencia de los estrógenos y disminuye por la de progesterona y vitamina D. Como ya se ha comentado, cumplen un papel activo en la vasculatura pulmonar, pudiendo concluir

que el desarrollo de la HAP pudiera depender en parte de la distribución de estos receptores, además de la edad, el sexo, el estado clínico y el nivel de hormonas circulantes.



**Figura 5. Rutas de señalización intracelular del estradiol: efectos nucleares y vías alternativas (Tomado de Ref. 24).**

Los estrógenos pueden modificar las funciones celulares a través de diferentes rutas de señalización intracelular, directamente en el núcleo involucrando a sus receptores como factores de transcripción, o a través de rutas alternativas iniciadas en los R de membrana o en el citosol cuyas dianas pueden ser locales (canales iónicos, excitabilidad...) y por tanto rápidas, o activando cascadas de señalización que en último término pueden afectar la transcripción génica (figura 5, ref.24 ). En estas rutas intervienen receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , canales activados por voltaje y diferentes mensajeros intracelulares y enzimas tipo quinasas. El estradiol tiene efectos beneficiosos vinculados con el aumento de los niveles de NO y prostaciclina, y con la disminución de endotelinas; presenta un efecto antimitótico inhibiendo el remodelado vascular. Esta hormona también activa los canales de potasio y la ruta de AMPc, favoreciendo la vasodilatación. Por el contrario, se ha observado que tras realizar una ooforectomía, el tratamiento con estradiol exacerba las lesiones vasculares en la HAP<sup>23</sup>. Se ha observado que algunos hombres con HAP idiopática presentan niveles elevados de estradiol<sup>22</sup>.

La progesterona también influye en la señalización vascular ya que existen receptores para dicha hormona en las células endoteliales. Esta hormona inhibe la proliferación de las células endoteliales y presenta propiedades vasodilatadoras en lechos vasculares, ajustándose a un efecto vasoprotector.

La serotonina induce la proliferación y la vasoconstricción de las células musculares lisas de las arterias pulmonares y participa en la fisiopatología de la HAP, observándose un aumento de la expresión del transportador de serotonina SERT en pacientes con HAP. Los hallazgos obtenidos con animales de experimentación

permiten indicar que la serotonina facilita el daño provocado por los estrógenos en modelos de HAP.

La CYP1B1 es una enzima que interviene en el metabolismo de los estrógenos; un polimorfismo en el gen que codifica CYP1B1 se relaciona con la alteración de BMPR2; tanto la hipoxia, como la serotonina y los estrógenos aumentan la expresión de CYP1B1 y se vinculan con la aparición de HAP. En la actualidad CYP1B1 es un blanco terapéutico de interés para el tratamiento de esta enfermedad<sup>23</sup>.

Por otro lado, los andrógenos, como la testosterona, son perjudiciales en la HAP ya que están relacionados con hipertrofia y fibrosis de ventrículo derecho; se ha observado un aumento del riesgo cardiovascular tras la administración de andrógenos en modelos animales de HAP con edad avanzada.

En resumen, de los datos recogidos en la bibliografía se concluye que en la hemodinámica de la enfermedad vascular pulmonar influyen tanto los estrógenos como los andrógenos de una forma compleja y en el caso de los estrógenos de forma paradójica<sup>21</sup>.

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Como ya se ha comentado anteriormente la hipertensión pulmonar no tiene cura. Es clasificada por su incidencia como enfermedad rara. La complejidad de los factores patogénicos que concurren en la HAP dificulta su estudio, lo que ha llevado al desarrollo de varios modelos animales de laboratorio con objeto de recrear un escenario fisiopatológico que simule la HAP en humanos. El propósito es estudiar los posibles mecanismos implicados y probar la eficacia de diferentes aproximaciones terapéuticas destinadas a interrumpir la cadena de eventos que desencadenan o agravan dicha enfermedad.

El modelo animal elegido en este trabajo consiste en un modelo de hipertensión pulmonar originado por la exposición crónica a hipoxia mantenida (11% O<sub>2</sub> durante 15 días) en ratas adultas hembras. Nuestro objetivo global es generar un modelo que mantenga las diferencias encontradas en la clínica entre hombres y mujeres para estudiar los factores que determinan las diferencias de sexo en la incidencia y transcurso de la enfermedad. Habitualmente en los modelos animales de laboratorio, así como en los ensayos clínicos con animales, se utilizan animales de género macho, un hecho que se ha empezado a relacionar con el alto índice de fracaso en dichos ensayos cuando se tratan de trasladar los resultados a la población humana donde al menos un 50% son mujeres.

Los **objetivos** concretos de este trabajo realizado para obtener la titulación de Máster han sido:

1. Generar y caracterizar el modelo animal de HAP en rata hembra mediante la exposición a hipoxia crónica mantenida y chequear sus valores de presión arterial sistémica y pulmonar.
2. Comparar el desarrollo de hipertensión pulmonar, así como de otros parámetros cardiocirculatorios asociados, en ratas machos y hembras a lo largo de un curso temporal de hipoxia de 7 y 14 días.
3. Caracterizar el grado de afectación de las propiedades contráctiles de la vasculatura pulmonar, en la función endotelial y el posible papel protector de los estrógenos aplicados in vitro.

A más largo plazo, el grupo de investigación que me ha acogido para la realización de este TFG se propone generar y caracterizar un modelo animal similar en ratas hembras viejas y en ratas jóvenes ovariectomizadas para estudiar/demostrar el papel de los estrógenos endógenos en el dimorfismo sexual observado en la HAP en humanos.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales de experimentación

En este estudio se han empleado 80 ratas Wistar, machos y hembras, de 3 meses de edad. Los animales han tenido libre acceso a agua y comida, bajo condiciones controladas de luz humedad y temperatura cumpliendo la legislación actual vigente sobre el bienestar animal (Real Decreto 53/2013, Artículo 6).

Cada grupo macho/hembra se ha dividido aleatoriamente en 3 subgrupos: uno, expuesto a 7 días de hipoxia crónica (HC 11% O<sub>2</sub>), otro a 15 días de HC y por último un grupo control respirando aire ambiental. Se han pesado las ratas al inicio del procedimiento, a los 7 y a los 15 días de HC.

Se han realizado medidas *in vivo*, monitorizando la presión arterial sistémica (PAS), presión arterial pulmonar (PAP) y la frecuencia cardiaca (FC) y medidas *in vitro*. A partir de la sangre se ha obtenido el hematocrito (HCT) y a partir del plasma se ha medido nitritos, L-arginina y sus metabolitos. Se han diseccionado las arterias pulmonares para realizar miografías y el corazón para obtener el índice de Fulton. Las arterias pulmonares se han homogenizado para medir expresión de eNOS

A continuación, se muestra un esquema de los grupos, procedimientos y datos obtenidos tanto en hembras como en machos.

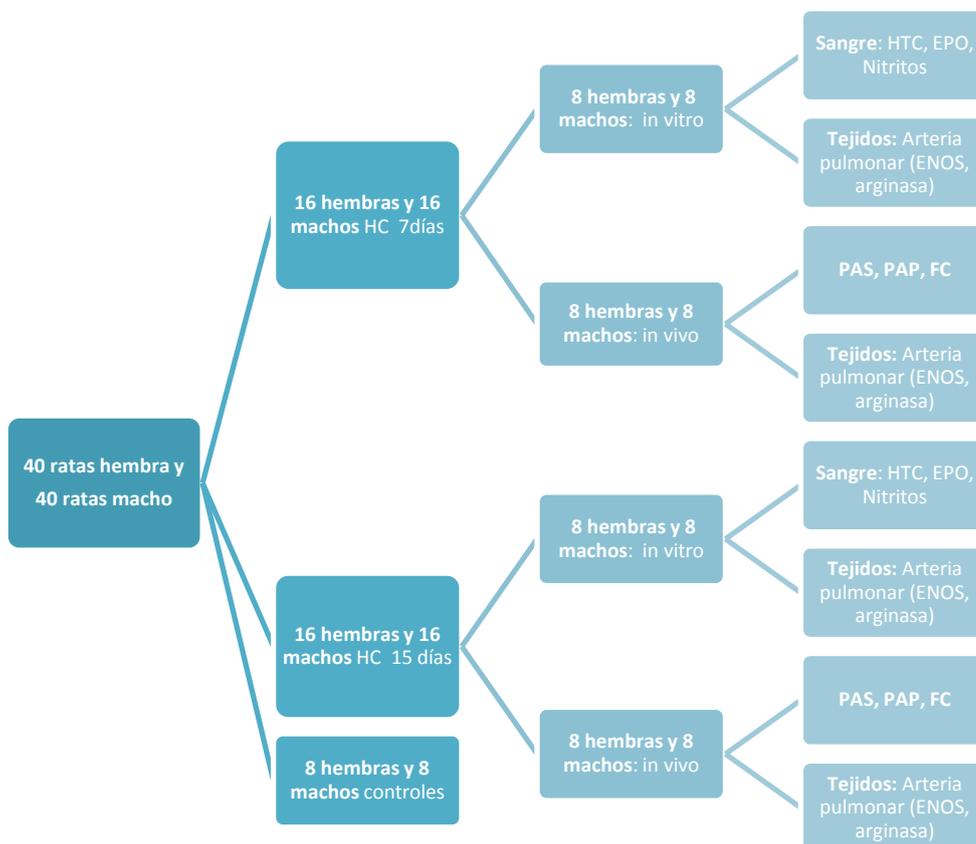
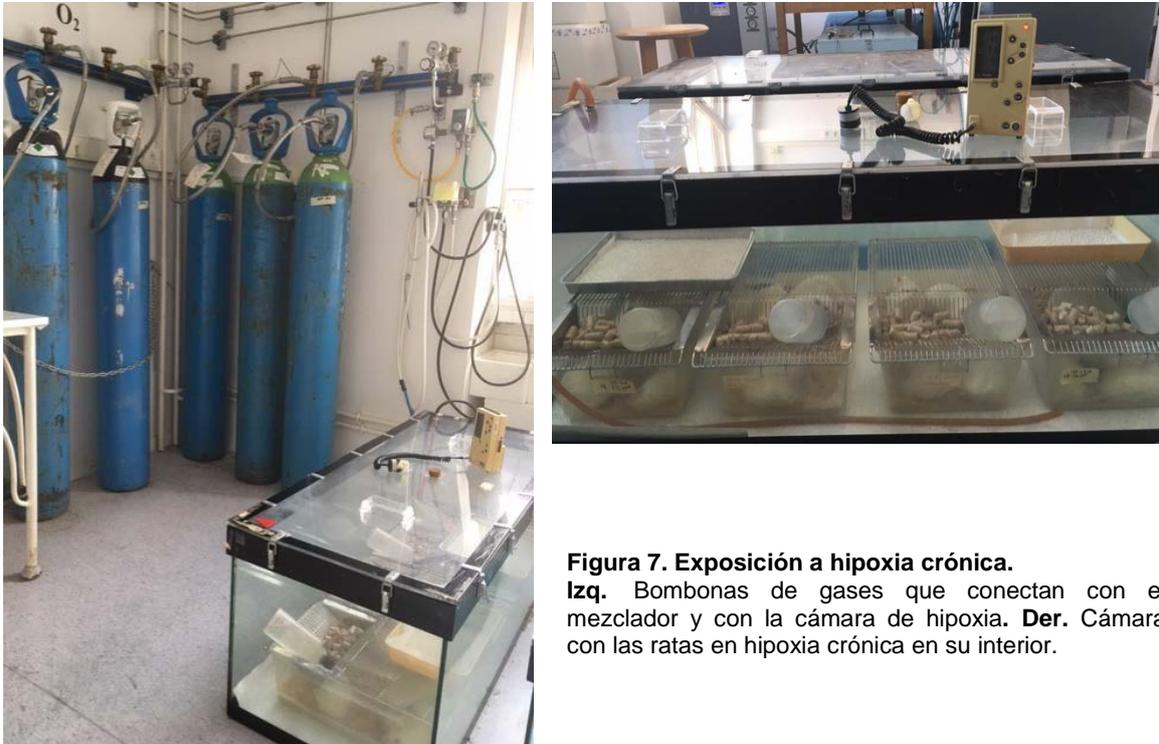


Figura 6. Esquema de los grupos y procedimientos utilizados

La exposición a hipoxia crónica (figura 7) se ha realizado mediante una cámara de dimensiones 120x50x25 cm con tapa ajustable, una entrada de aire conectada a un mezclador de gases (aire y N<sub>2</sub> regulable) ajustado a 11% O<sub>2</sub> y a un flujo constante de 3L/min y una salida de aire para evitar la acumulación de CO<sub>2</sub>. La concentración de O<sub>2</sub> ha sido controlada mediante un oxímetro. Para evitar la acumulación de CO<sub>2</sub> y vapor

de agua, se ha utilizado soda lima de color blanco, que cambia a violeta una vez saturada. Cada 3-4 días se ha abierto la cámara, durante el mínimo tiempo posible; para limpiar las jaulas y reponer alimento y el agua. Se ha evitado la coincidencia de machos y hembras en la misma cámara.

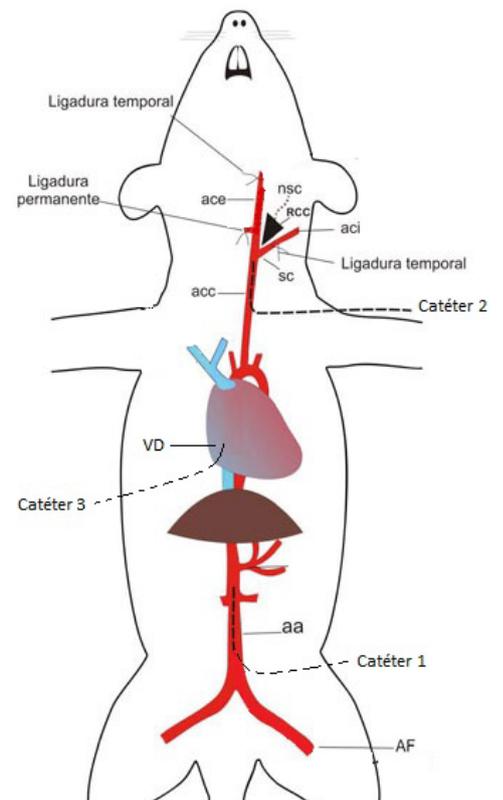


**Figura 7. Exposición a hipoxia crónica.**  
**Izq.** Bombonas de gases que conectan con el mezclador y con la cámara de hipoxia. **Der.** Cámara con las ratas en hipoxia crónica en su interior.

### 3.2 Técnicas quirúrgicas

Las ratas se han anestesiado con pentobarbital sódico (60mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. En primer lugar, se ha realizado una traqueotomía para permeabilizar la vía aérea y poder asegurar el bombeo de la sangre el mayor tiempo posible. Para extraer sangre sistémica se ha canalizado con un catéter la arteria aorta abdominal, pinzando el vaso por los dos extremos y realizando un pequeño corte para crear la incisión por donde se ha introducido el catéter (Catéter 1, figura 8), previamente heparinizado. A continuación, se ha liberado el pinzamiento próximo al corazón para poder extraer la sangre (figura 9). De esta muestra se ha obtenido HTC, EPO, nitritos y arginina/ADMA.

Una vez extraída la sangre se procede a recolectar otros órganos: corazón (índice de Fulton) y pulmones, principalmente. A partir de los pulmones se disecciona la arteria pulmonar para realizar las miografías y para estudiar la expresión de proteínas por Western Blot



**Figura 8. Representación de las técnicas realizadas *in vivo***  
**Registro de PAS, PAP y obtención de sangre.** Símbolos: aa - aorta abdominal, acc -arteria carótida común, ace -arteria carótida externa, aci -arteria carótida interna, AF - arteria femoral, VD - ventrículo derecho, RCC receptores del cuerpo carotideo, NSC - nervio del seno carotideo.

### 3.3 Registro de Presiones: sistémica (PAS) y pulmonar (PAP)

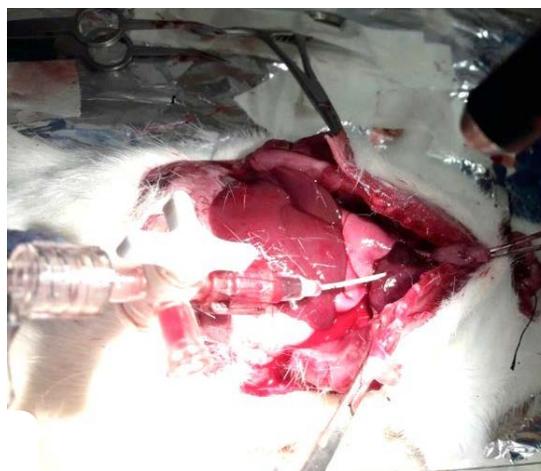
Para realizar el registro de presiones, primero se canaliza la arteria carótida común por el mismo método que en la extracción de sangre. Una vez canulada la arteria, se coloca un transductor de presión en el catéter (catéter 2, figura 8) para registrar los parámetros de la presión sistémica (presión sistólica, presión diastólica y presión del pulso) y frecuencia cardíaca.

Seguidamente se obtiene la presión arterial pulmonar; se introduce el catéter (catéter 3, figura 8) mediante una punción en el ventrículo derecho, y se guía hasta la arteria pulmonar valorando las variaciones en el registro de presiones; cuando el catéter se encuentra en arteria pulmonar (figura 10) se ha realizado un test hipóxico durante 1 minuto a 7% O<sub>2</sub>, para valorar la VPH y su recuperación.

Finalmente en estas ratas se ha extraído también la arteria pulmonar para hacer miografías y el corazón para medir el índice de Fulton.



**Figura 9. Extracción de sangre.** Catéter canalizando la arteria aorta abdominal.



**Figura 10. Registro de presiones.** Catéter introducido por el ventrículo derecho que está registrando la PAP.

### 3.4 Contractibilidad de la arteria pulmonar medida por Miografía de alambre

Para poder medir la capacidad contráctil de las arterias pulmonares como índice del posible remodelado vascular y disfunción endotelial por la exposición a la HC, se han realizado miografías mediante un miógrafo de tensión (figura 11).

Tras la disección de un fragmento de arteria procedente de la rama principal de la arteria pulmonar, se han montado las cámaras (figura 11) introduciendo dos alambres en el interior de cada fragmento de arteria que se pueden separar para tensar la arteria convenientemente. En uno de los extremos de la cámara se encuentra el transductor que registra la tensión ejercida por la arteria. El miógrafo es multicanal y permite estudiar la contracción de 4 arterias simultáneamente.

Las cámaras se llenan con solución Krebs (118mM NaCl, 24mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM MgNO<sub>4</sub>, 0.435mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.56 mM glucosa, 1.8mM CaCl<sub>2</sub> y 4mM KCl) y se mantienen a 37°C durante 30 minutos, gaseando para mantener un pH de 7,4 (5%CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, resto N<sub>2</sub>).

La tensión basal ajustada en las arterias fue aproximadamente 6mN. Para comprobar que las arterias mantienen la capacidad contráctil se estimulan 3 veces sucesivamente con solución Krebs conteniendo 80mM de K<sup>+</sup> durante 3 min; entre cada estímulo se realiza un lavado con solución Krebs durante 12 minutos.

Se ha medido la contractibilidad de las arterias controles y experimentales administrando un vasoconstrictor, la fenilefrina (0,01-3 $\mu$ M) y la capacidad vaso-relajante del endotelio con carbachol (0.003-3 $\mu$ M; estimula la secreción de NO). Finalmente, para comprobar el efecto de los estrógenos sobre la contractibilidad vascular, se ha utilizado otro grupo a las que se ha administrado 17 $\beta$ -estradiol sobre arterias precontraídas con fenilefrina (0.1-0.3  $\mu$ M).



**Figura 11. A: Miógrafo de tensión. B: Cámara del miógrafo que contiene el fragmento de arteria pulmonar.**

### 3.5 Expresión de eNOS en arteria pulmonar mediante Western Blot

Mediante la técnica de inmunoblotting o Western Blot se ha estudiado la expresión de eNOS y  $\beta$ -actina en un homogenado de arteria pulmonar de ratas controles y experimentales, utilizando anticuerpos específicos.

Para ello se han preparado geles de poliacrilamida al 10% (running gel) con su correspondiente gel concentrador al 3% (stacking gel) dejando polimerizar cada parte durante 45 min. Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y se cargan las muestras previamente hervidas en el buffer de muestra y el marcador de peso molecular en sus pocillos correspondientes. A continuación, se llena la cubeta con buffer de electroforesis (0.25M Tris, 1.92M glicina, 1% de SDS) procurando que los geles se encuentren cubiertos y se activa el circuito eléctrico a un amperaje constante de 50mA. La zona del gel donde se encuentran las proteínas de interés se identifican gracias al marcador de peso molecular, ya que va dejando una serie de líneas de colores identificativas desde 250kD hasta 10kD; el peso molecular de la eNOS es 140kD y el de la  $\beta$ -actina 45kD.

Finalizada la electroforesis, se transfieren las proteínas presentes en el gel a la membrana de PVDF colocando ambos en forma de sándwich junto con papel de filtro todo ello empapado de buffer de transferencia (Tris/glicina/Metanol). Se introducen las láminas en la cubeta de transferencia cubiertas con buffer y se transfiere durante 60 minutos a 100mA en la cámara fría (a 4°C).

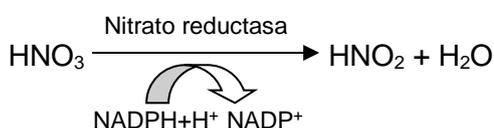
Para identificar las proteínas transferidas se incubó la membrana con las proteínas de interés con un anticuerpo (Ab) primario específico durante toda la noche. Previamente, se bloquea la membrana con tampón de bloqueo para evitar que el anticuerpo se pueda unir a zonas inespecíficas de la membrana (leche desnatada al 5%). Cada anticuerpo primario requiere una dilución en función de su especificidad; las diluciones que se han realizado han sido Ab 1° eNOS 1:500 y Ab 1°  $\beta$ -actina 1:2000.

Tras lavar la membrana tres veces con solución Tris-salino-Tween, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de la especie del primario conjugado con peroxidasa (HRP), en este caso un anti-*mouse* (1:2000), ya que los Ab primarios eran monoclonales.

Para visualizar las bandas de proteínas se añade sobre las membranas un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa, que va a interactuar exclusivamente con las proteínas que llevan unido el anticuerpo secundario. Se coloca encima una película fotográfica y se revela en una máquina de revelado (Kodak). Las bandas reveladas en las películas se han escaneado y analizado con el software ImageJ, utilizando la  $\beta$ -actina como normalizador interno.

### 3.6 Determinación de nitritos en plasma

Para valorar la concentración de NO en plasma se han cuantificado los nitritos mediante la prueba de Griess. Para ello, se ha realizado la siguiente reducción enzimática de nitratos mediante la nitrato reductasa, detectando los nitritos con el reactivo Griess.



Para la realización de esta técnica, se han usado dos placas de 96 pocillos, en las que se han distribuido las muestras de plasma obtenido de las ratas controles y expuestas a HC (7 y 15 días) procedentes de machos y hembras, junto con la curva standard. Los nitritos interactúan con el reactivo de Griess generando un color rosado. Se valora la concentración de nitritos en función de la intensidad de color rosado comparándolos con la curva patrón mediante un lector de placas a 540nm.

### 3.7 Medición de L-arginina y ADMA en plasma

Para determinar la concentración de L-Arginina y ADMA en plasma se ha utilizado la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con un detector de fluorescencia.

En primer lugar, se han preparado las muestras de plasma diluyéndolas en PBS y añadiendo un estándar interno (monometil-arginina). Se ha realizado una extracción en fase sólida en columna (Oasis MCX 1cc, 30mg) utilizando un sistema de vacío. Como pre-acondicionamiento de las columnas se ha pasado una solución eluyente conteniendo amonio, NaOH, H<sub>2</sub>O y metanol, seguido de un lavado con H<sub>2</sub>O. A continuación se han pasado las muestras preparadas en PBS, se han lavado con HCl y metanol y, para finalizar, se han eluido las columnas con el mismo eluyente recogiendo las muestras en tubos eppendorfs para su congelación a -20°C. Las muestras han sido analizadas en el laboratorio de técnicas instrumentales de la Universidad de Valladolid, al carecer nuestro HPLC de detector de fluorescencia.

### 3.8 Análisis de datos

Los datos han sido analizados usando el programa estadístico Graph Pad Prism v6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Todos los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) y las diferencias estadísticas entre grupos fueron calculadas según la presentación y comparación de los datos utilizando One way ANOVA con test de comparación múltiple (Newman-Keuls) o Two way ANOVA con test de comparación múltiple (Sidak's). Los valores de  $p < 0,05$  representan diferencias estadísticamente significativas.

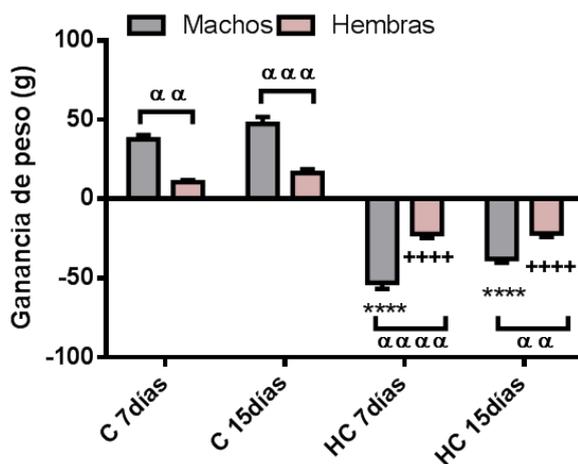


## 4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras realizar las diferentes técnicas mencionadas, en hembras y machos, nos dan información acerca de la variación en el peso de las ratas, el hematocrito, la presión sistémica y pulmonar, los parámetros cardíacos mediante el índice de Fulton y la frecuencia cardíaca, la expresión de eNOS en arteria pulmonar, el tono vascular en respuesta a estrógenos y la concentración de arginina, sus metabolitos así como nitritos en plasma.

### 4.1 Variación en el peso

Tras registrar los pesos de las ratas durante todo el procedimiento, se ha observado que en situación control, es decir en normoxia, tanto los machos como las hembras ganan peso durante 7 y 15 días, ganancia que es mayor en machos al menos en valor absoluto. Durante la exposición a HC, tanto las hembras como los machos muestran pérdidas de peso significativas en comparación con sus controles, tanto a 7 días como a 15 días de HC (figura 11).

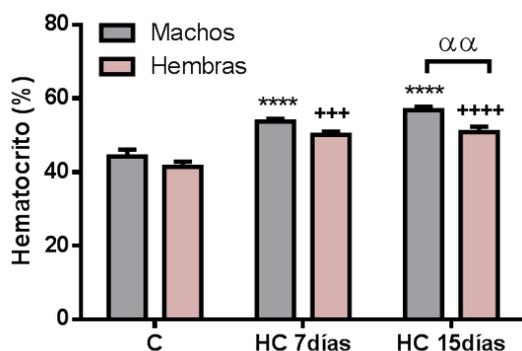


**Figura 11. Variación del peso de ratas hembras y machos controles frente a expuestas a HC, a 7 días y a 15 días.** En gris se muestran los machos y en rosa las hembras; la ganancia de peso se expresa en gramos (g). Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM; n=16 (\*\*\*\*p<0.0001 vs Ratas control machos, ++++p<0.0001 vs Ratas control hembras,  $\alpha\alpha$  p<0,01,  $\alpha\alpha\alpha$  p<0,001,  $\alpha\alpha\alpha\alpha$  p<0,0001 ratas machos vs hembras. Two way ANOVA.

Los machos muestran diferencias significativas de peso en comparación con las hembras tanto en situación control como en HC de 7 y de 15 días, siendo mayor la diferencia a los 7 días.

### 4.2 Hematocrito

Como era de esperar, se observa un aumento progresivo del HTC a medida que aumentan los días de exposición a HC, tanto en machos como en hembras (figura 12), mostrando diferencias significativas a 7 y 15 días de HC en comparación con los valores controles. Sólo a los 15 días de HC se aprecia un aumento significativamente mayor en machos que en hembras.



**Figura 12. Variación del HTC en machos/hembras en HC.** El valor de HTC se expresa en porcentaje (%). Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM; n=5-11 (\*\*\*p<0.0001 vs ratas control machos, +++p<0.001, ++++p<0.0001 vs ratas control hembras,  $\alpha\alpha$  p<0,01 machos vs hembras). Two way ANOVA.

### 4.3 Medidas de presión arterial sistémica y pulmonar

#### 4.3.1 Presión arterial sistémica y pulmonar

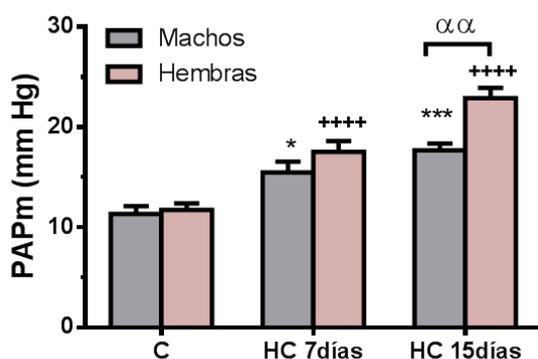
En los primeros resultados obtenidos en las medidas de presión arterial sistémica y pulmonar, en ratas controles y expuestas a HC, de ambos sexos, no se observan cambios significativos en la PAS tras la exposición a HC de 7 y 15 días en ninguno de los dos sexos (Tabla I).

Sin embargo, en las medidas de la PAP se observan diferencias estadísticamente significativas que se acentúan a medida que aumentan el tiempo de exposición a la HC. Los machos solo presentan la PAP aumentada en HC de 15 días mientras que las hembras presentan un efecto hipertensivo pulmonar desde los 7 días de HC.

Machos	Control	HC 7días	HC 15días
PA sistémica (mmHg)	97,6 ± 7,2	98,2 ± 7,7	92,2 ± 8,1
PAPm (mmHg)	15,2 ± 1,0	13,2 ± 1,3	24,8 ± 1,4 ***
Hembras	Control	HC 7días	HC 15días
PA sistémica (mmHg)	101,7 ± 16,6	116,0 ± 2,9	
PAPm (mmHg)	11,74 ± 0,6	17,53 ± 1,1 ++	22,88 ± 1,0 +++

**Tabla 1. Medias de PA sistémica y PAP en hembras y machos en normoxia (control) y 7 y 15 días de HC.** Los valores de presión se expresan en mmHg. Los datos se presentan como media ± ESM; n=8. (++)p<0.01, (+++)p<0.001 vs ratas control hembras; \*\*\*p<0.001 vs ratas control machos). One way ANOVA.

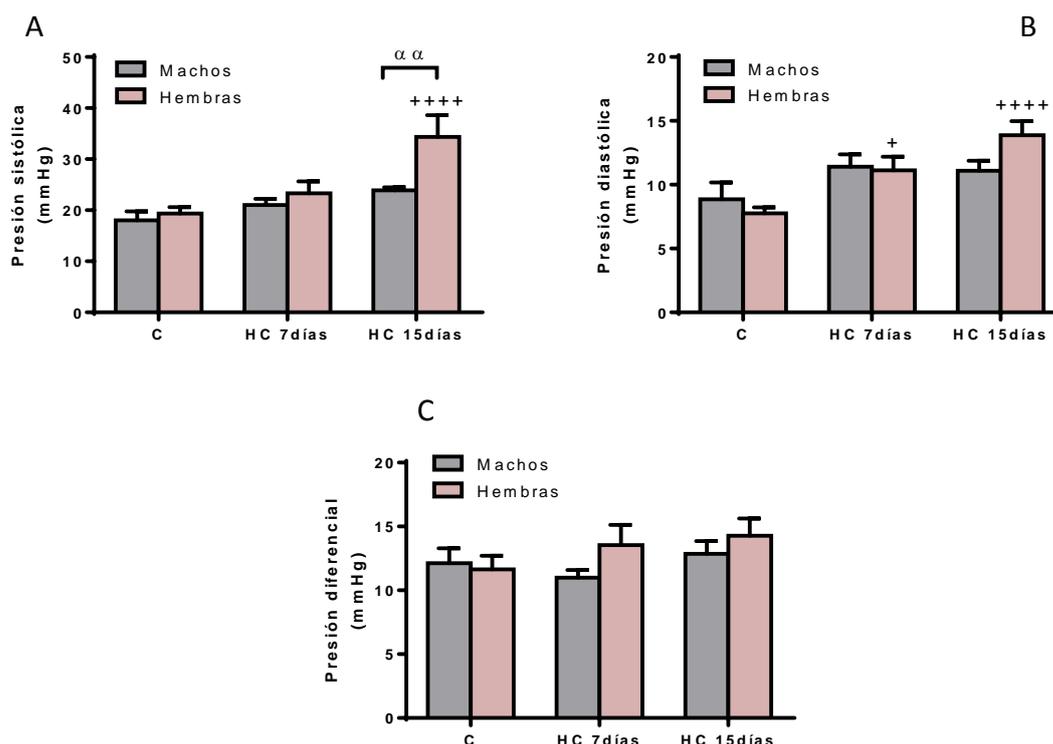
Tras registrar la PAP en otro grupo de animales (figura 14), se observa un aumento progresivo de la presión arterial pulmonar tras la HC de 7 y 15 días, tanto en hembras como en machos, pero mostrando las hembras mayores diferencias significativas a 7 y 15 días de HC, respecto a sus controles. En el grupo de ratas machos se observa un aumento de la PAP a 7 días de HC, aunque menor que en las hembras, apareciendo diferencias significativas entre hembras y machos a 15 días de HC con una PAP visiblemente mayor en hembras (22.9mmHg en hembras vs 17.7mmHg en machos).



**Figura 14. Variación de PAP en hembras y machos en situación control, a 7 días de HC y a 15 días.** En gris se muestran los machos y en rosa las hembras; los valores de presión se expresan en mmHg. Los datos se presentan como media ± ESM. (++++p<0.0001 vs ratas control hembras, \*p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs ratas control machos, αα p<0,01 ratas machos vs hembras; n=8 Two way ANOVA.

La PAP sistólica (figura 15A) aumenta de manera estadísticamente significativa en las ratas hembras expuestas a HC 15 días respecto a sus controles. Este aumento no se observa en los machos, en ninguno de los tiempos de exposición a HC.

En la figura 15B se muestra un aumento de la PAP diastólica en hembras a medida que aumenta el tiempo de exposición a HC, respecto a sus controles; por el contrario, en los machos no hay cambios estadísticamente significativos respecto a los controles, aunque se observa una tendencia a aumentar en HC. En la figura 15C la presión diferencial (presión del pulso) tiende a aumentar en las ratas hembras aunque no existen diferencias estadísticamente significativas. En las ratas machos no se observan cambios con la exposición a HC (7 y 15 días) respecto a los controles.



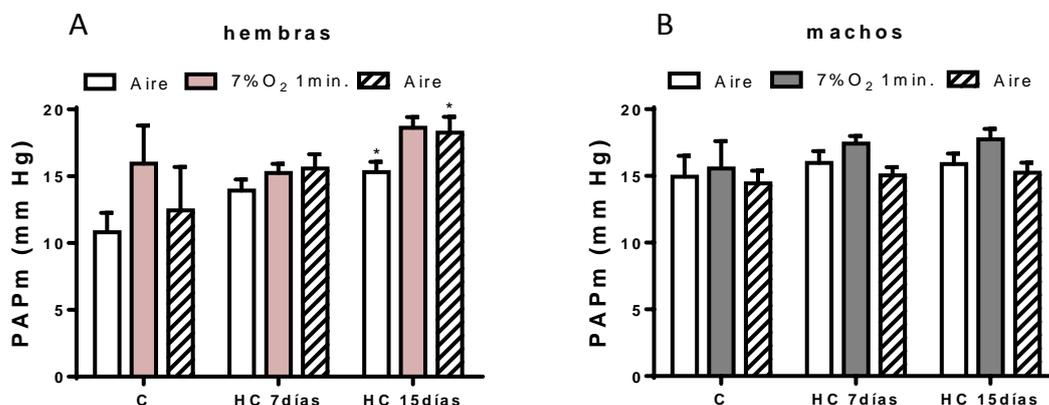
**Figura 15. A: Variación de PAP sistólica en hembras y machos controles, a 7 y a 15 días de HC.** Los valores de presión se expresan en mmHg. (++++ p<0.0001 vs ratas hembras control; α α p<0,01 ratas machos vs hembras). **B: Variación de PAP diastólica en hembras y machos controles, a 7 y a 15 días de HC.** (+ p<0.05 vs ratas hembras control, +++++ p<0.0001 vs ratas hembras control). **C: Presión diferencial en ratas hembra y macho controles, a 7 y 15 días de HC.** Los datos se presentan como media ± ESM; n= 8. Two way ANOVA.

Los resultados obtenidos de la PAP están de acuerdo con la bibliografía consultada y las observaciones clínicas, ya que en hembras observamos un desarrollo más rápido de la hipertensión pulmonar en comparación con los machos.

#### 4.3.2 Medida de la vasoconstricción pulmonar hipóxica

Para comprobar si además de la hipertensión pulmonar desarrollada tras la exposición a HC, se conserva o no el mecanismo de la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), se realizó un test de respuesta pulmonar a la hipoxia aplicada de forma aguda. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. Tras la aplicación de una hipoxia del 7%O<sub>2</sub> durante 1 min, en las ratas hembras controles (figura 16A) se produce un aumento de la PAP con recuperación al volver a respirar aire; tras 7 y 15 días de HC el aumento de la PAP es menor y no se recuperan las presiones basales.

Esto podría sugerir que entre las modificaciones a nivel vascular pulmonar que la HC produce se encuentra la pérdida parcial de la contractibilidad hipóxica de las arterias pulmonares en las ratas hembras. En todos los grupos de machos (figura 16B), la magnitud de la VPH fue muy pequeña, hecho que podría estar relacionado con la disminución obligada del tiempo del test hipóxico (de 3 a 1 min) debido a la mala tolerancia de las ratas expuestas a HC, que supuso además una disminución en el tamaño muestral. Por otro lado, los valores basales están anormalmente altos lo que podría explicar en cierto modo la falta de respuesta al test hipóxico.



**Figura 16. A: Respuestas del test de VPH en hembras controles y expuestas a HC 7 y 15 días.** Las barras blancas muestran la PAPm mientras las ratas respiran aire, en rosa mientras respiran 7% O<sub>2</sub> durante 1 minuto y rayadas en la recuperación con aire. Los valores de presión se expresan en mmHg. Los datos se presentan como media ± ESM. (\*p<0.05 vs ratas control hembras) **B: Respuesta del test de VPH en machos controles y expuestos a HC 7 y 15 días.** Las barras blancas muestran la PAPm en aire, gris en 7%O<sub>2</sub> durante 1 minuto y rayadas, la recuperación con aire. Los datos se presentan como media ± ESM; n= 3-8; Two way ANOVA.

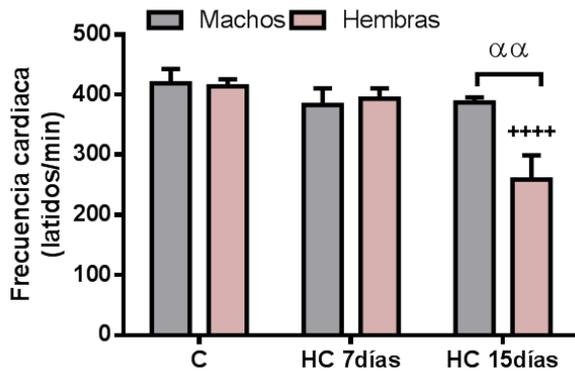
#### 4.4 Parámetros cardíacos

Los parámetros cardíacos medidos han sido la frecuencia cardíaca (FC) y la posible hipertrofia ventricular derecha medida como índice de Fulton, en cada una de las situaciones de HC en ambos sexos. El índice de Fulton se ha obtenido diseccionando el corazón, retirando las aurículas y los vasos y calculando los pesos en gramos del ventrículo derecho (VD) y del septum+ventrículo izquierdo (VI) por otro:

$$\text{Índice de Fulton} = \frac{VD}{VI + \text{Séptum}}$$

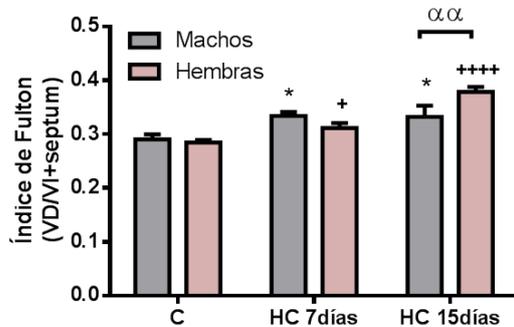
El resultado del índice de Fulton es un indicador del nivel de hipertrofia que presenta el VD en relación al resto del corazón.

Valorando la FC (figura 17) se observa solo en hembras una disminución progresiva a medida que aumenta el tiempo de exposición a HC, siendo estadísticamente significativa a los 15 días respecto a los controles. Por el contrario, los machos no presentan apenas variación de la FC en los distintos grupos estudiados. Se observa por tanto diferencias significativas entre hembras y machos en HC a 15 días.



**Figura 17. Variación de la FC en hembras y machos controles, a 7 y 15 días de HC.** Los valores de FC se muestran en latidos/minuto. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM; n=5-8 (++++ p<0.0001 vs ratas hembras control;  $\alpha\alpha$  p<0.01 HC 15d machos vs hembras). Two way ANOVA.

Cuando analizamos el índice de Fulton (figura 18) se observa hipertrofia del VD en los animales expuestos a HC 7 y 15 días, tanto en hembras como en machos. A diferencia de los machos, las hembras muestran un aumento mayor y más significativo a los 15 días respecto a sus controles. A este tiempo, por tanto, aparecen diferencias significativas entre hembras ( $0.38 \pm 0.01$ ) y machos ( $0.33 \pm 0.02$ ).

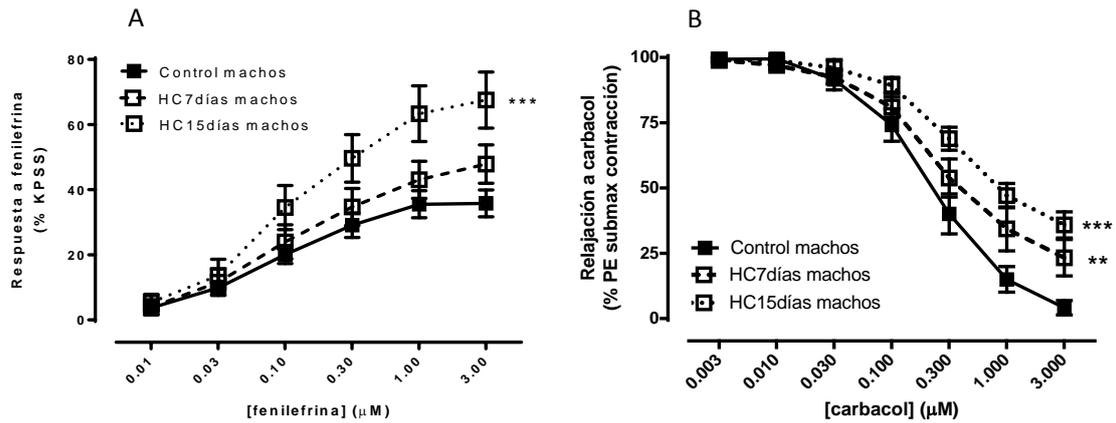


**Figura 18. Variación del índice de Fulton en hembras y machos controles, a 7 y 15 días de HC.** Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM; n=16 (+p<0.05; ++++ p<0.0001 vs ratas hembra control; \*p<0.05 vs ratas macho control;  $\alpha\alpha$  p<0.01 machos vs hembras a HC 15d). Two way ANOVA.

#### 4.5 Propiedades contráctiles de las arterias pulmonares: efecto del $17\beta$ -estradiol

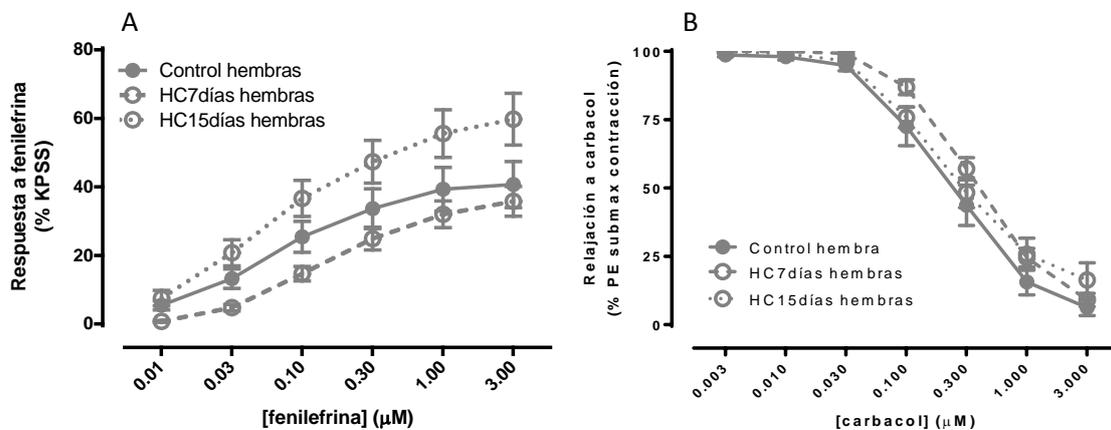
De los resultados obtenidos en las miografías se puede observar la contractibilidad en respuesta a fenilefrina (vasoconstrictor) y carbacol (vaso-relajante) tanto en machos como en hembras de todos los grupos de animales.

Como muestra la figura 19A, tras administrar fenilefrina ( $0.01$ -  $3.0\mu\text{M}$ ) a las arterias pulmonares de ratas machos, se observa un aumento progresivo de la vasoconstricción en función de la dosis de fenilefrina, expresado como % de la respuesta contráctil a  $80\text{mM}$  de  $\text{K}^+$  (KPSS). Los machos expuestos a HC presentan una mayor vasoconstricción en comparación con los controles, mostrando diferencias significativas a 15 días de HC. Tras la administración de carbacol se observa una disminución en la capacidad vasodilatadora en las ratas expuestas a HC, mostrando diferencias significativas a 7 días que aumentan progresivamente con el tiempo de hipoxia, en comparación con las ratas control (figura 19B).



**Figura 19. A: Contractibilidad de la arteria pulmonar en respuesta a Fenilefrina en machos.** En línea continua se representan las arterias de ratas machos controles, en línea discontinua las de ratas expuestas a HC 7 días y en puntos, las de 15 días. **B: Contractibilidad de la arteria pulmonar en respuesta a Carbacol en machos.** En línea continua se representan las arterias de ratas controles, en línea discontinua las de ratas en HC 7 días y en puntos las de 15 días. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs ratas machos control;  $n = 10-12$ ). One way ANOVA.

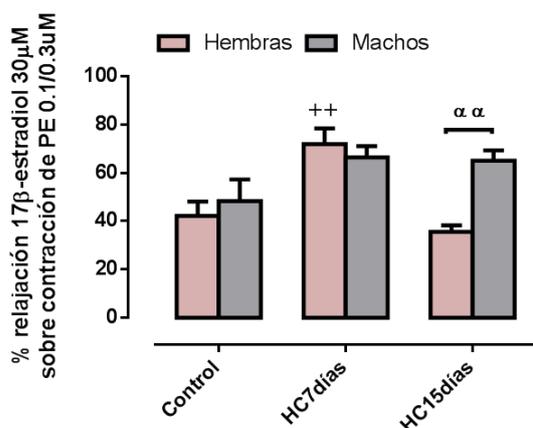
En la miografía realizada en arterias de ratas hembras (figura 20), a diferencia de los machos, se observa que la fenilefrina no modifica la contracción de las arterias pulmonares de las ratas expuestas a HC (7 y 15 días) respecto a las de sus controles. Al administrar carbacol tampoco se observan diferencias en la capacidad de relajación de las arterias pulmonares de los distintos grupos de animales.



**Figura 20. A: Contractibilidad de la arteria pulmonar en respuesta a Fenilefrina en hembras.** En línea continua se representan las arterias de ratas hembras controles, en línea discontinua las de ratas expuestas a HC 7 días y en puntos las de 15 días. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM. **B: Contractibilidad de la arteria pulmonar en respuesta a carbacol en hembras.** En línea continua se representan las arterias de ratas hembras controles, en línea discontinua las de ratas expuestas a HC 7 días y en puntos las de 15 días. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM ( $n = 11-16$ ). One way ANOVA.

Tras la administración de  $17\beta$ -estradiol a las arterias pulmonares, para valorar su efecto sobre la contractibilidad (figura 21), se ha observado un aumento de la vasodilatación en ambos sexos en HC a 7 días, significativa en hembras respecto a sus controles; esto podría sugerir un aumento en la sensibilidad a los estrógenos tras la exposición a HC o un aumento de receptores de estrógenos.

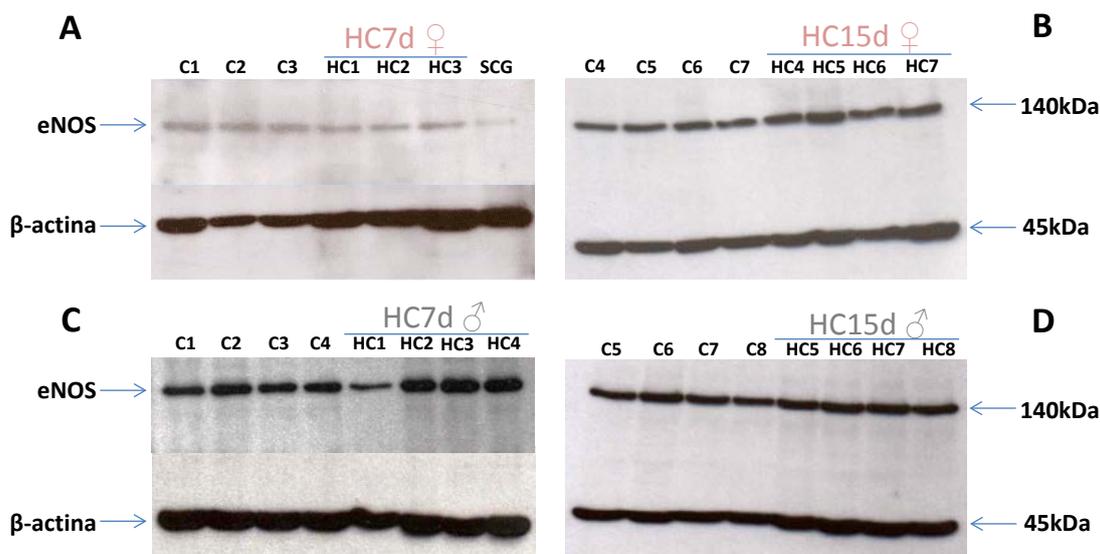
Paradójicamente, a los 15 días de HC se observa solo en hembras una pérdida drástica de los efectos vaso-relajantes del 17β-estradiol.



**Figura 21. Vasodilatación de arterias pulmonares de macho y hembras en respuesta a estradiol en situación control, en HC de 7 días y de 15 días.** En gris se muestran los machos y en rosa las hembras. Los datos se presentan como media ± ESM; n=9-12 (++)p<0,01 vs ratas hembras control; αα p<0,01 machos vs hembras). Two way ANOVA.

#### 4.6 Expresión de eNOS en arteria pulmonar

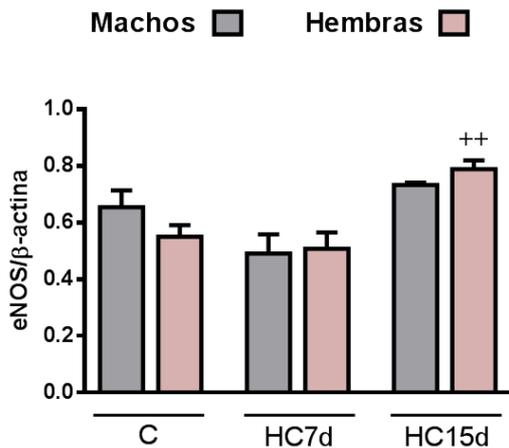
Mediante Western Blot, hemos analizado la expresión de eNOS en arteria pulmonar de ratas macho y hembra en todas las situaciones experimentales.



**Figura 22. Expresión de eNOS por Western Blot en arteria pulmonar de machos y hembras.** **A:** Comparación de hembras controles con hembras HC de 7 días. **B:** Comparación de hembras controles con hembras HC de 15 días. **C:** Comparación de machos controles con machos HC de 7 días. **D:** Comparación de machos controles con machos HC de 15 días.

En los resultados obtenidos en hembras (figura 22A y B), parece observarse una disminución de la expresión de eNOS en hembras a 7 días de HC y un aumento a los 15 días de HC en comparación con sus respectivos controles. En machos (figura 22C y D) se observa un aumento en la expresión de eNOS a 7 días de HC, sin cambios aparentes a los 15 días, respecto a sus controles.

Tras realizar una semicuantificación de la intensidad de las bandas respecto a las de  $\beta$ -actina (figura 23), se observa un aumento tanto en hembras como en machos, respecto a sus controles, a los 15d de HC, aunque solo en las hembras es significativo.

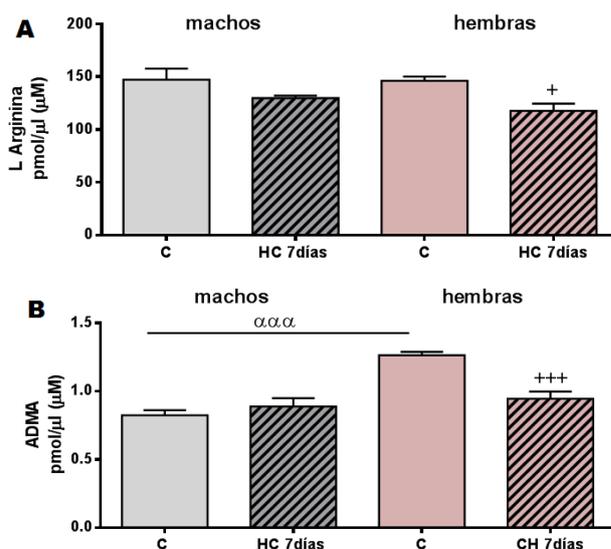


**Figura 23. Representación gráfica de la presencia de eNOS/ $\beta$ -actina en hembras y machos controles, en HC de 7 días y de 15 días.** En gris se muestran los machos y en rosa las hembras. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM. (<sup>++</sup>  $p < 0,01$  vs ratas hembras control;  $n=6-14$ ). Two way ANOVA.

En resumen, los resultados sugieren una disminución inicial de la expresión de eNOS a los 7 días de exposición a HC, tanto en hembras como en machos, con tendencia a la recuperación en las hembras a hipoxias más prolongadas.

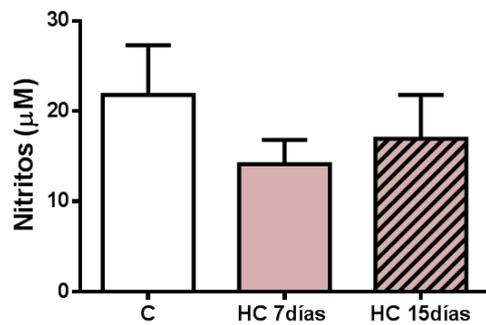
#### 4.7 Medida de nitritos, L-arginina y ADMA en plasma

Tras medir los niveles plasmáticos de nitritos, L-arginina y ADMA, se observa una disminución de L-arginina tanto en hembras como en machos siendo sólo estadísticamente significativa en las ratas hembras a 7 días de HC (figura 24A). La concentración de ADMA en plasma (figura 24B), es significativamente mayor en hembras que en machos, en situación control; tras 7 días de HC se produce una disminución significativa en la concentración de ADMA en hembras, sin variación en los machos.



**Figura 24. A: Concentración plasmática de L-arginina.** En gris se muestran los machos, en rosa las hembras, en rayado, HC de 7 días. **B: Concentración plasmática de ADMA.** Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM;  $n=8$ ; (<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>+++</sup>  $p < 0,001$  vs ratas hembras control;  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0,001$  machos vs hembras). One way ANOVA.

En la Figura 25 se muestra los niveles plasmáticos de nitritos en hembras. Se observa una tendencia a disminuir a los 7 y 15 días de HC, aunque no significativa. Dado que la medida de los nitritos representa una medida indirecta del NO, estos resultados sugieren que hay disminución de NO plasmático en HC, en consonancia con los datos obtenidos de eNOS.



**Figura 25. Concentración plasmática de nitritos en ratas hembras.** En barras blancas, ratas hembras control, en rosa, HC 7 días y en rayado, las HC 15 días. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM; (n=8). One way ANOVA.



## 5. DISCUSIÓN

El objetivo general propuesto en este trabajo de generar un modelo animal de HAP en ratas hembras mediante la exposición a hipoxia prolongada y mantenida (11%O<sub>2</sub>) para estudiar el posible dimorfismo sexual en el desarrollo de esta patología, ha sido satisfactoriamente conseguido. Se observan además diferencias significativas en muchos de los resultados entre hembras y machos a los 7 y 15 días de exposición a la hipoxia.

En primer lugar, se ha observado un empeoramiento del estado general de las ratas de ambos sexos a los 7 y 15 días de exposición a la hipoxia, manifestándose en el aspecto de los animales, en la pérdida de pelo y en la disminución progresiva del peso, más visible en los machos, que puede ser atribuída al cambio del metabolismo hacia metabolismo glicolítico anaerobio con menor ganancia energética.

Como se ha mencionado en la introducción, la HAP es una enfermedad rara que se caracteriza por un aumento de la presión pulmonar (>25 mmHg en humanos) generado por un aumento de las resistencias vasculares pulmonares, con hipertrofia del ventrículo derecho y fallo cardíaco en su transcurso final. En los resultados obtenidos en nuestro modelo animal se puede observar que no existen apenas diferencias en la PA sistémica tras la exposición a la HC, pero sí un aumento de la presión pulmonar en ambos sexos, dependiente del tiempo de exposición a la hipoxia. El aumento es más temprano y significativo en las hembras (figura 14).

A nivel cardíaco, se observa un aumento del índice de Fulton en ambos sexos, pero más acusado en hembras, dependiente del tiempo de hipoxia, que se relaciona directamente con una mayor y más rápida hipertrofia ventricular en las hembras. Este hecho puede dar cuenta del aumento mayor de la presión arterial y del hematocrito observado en hembras respecto a machos, dos parámetros directamente relacionados con un mayor requerimiento del trabajo cardíaco del corazón derecho y, por tanto, de la hipertrofia del ventrículo derecho. A los 15 días de HC se observa además una disminución significativa de la frecuencia cardíaca sólo en hembras (figura 17), no compensada por cambios del volumen de contracción cardíaco puesto que no hay cambios significativos de la presión del pulso (figura 15C). Ello sugiere una caída en el gasto cardíaco, indicativo del inicio de una insuficiencia cardíaca en hembras.

A nivel de las respuestas vasculares a la hipoxia, se observa en general un pérdida de la VPH al test de hipoxia aguda, que se manifiesta bien por la falta de recuperación de la presión basal cuando se retira la hipoxia, como ocurre en las hembras, o bien por la propia ausencia de respuesta vasoconstrictora a la hipoxia, como ocurre en el caso de los machos. Estas observaciones sugieren la afectación del mecanismo vasoconstrictor sensible a hipoxia debido al mantenimiento prolongado de la hipoxia. Otra explicación alternativa de la falta de la respuesta VPH podemos encontrarla en el hecho de que el test hipóxico solo se pudo aplicar durante 1 min, quizá un tiempo insuficiente, debido a la baja tolerancia de las ratas expuestas a HC, especialmente de los machos. Sea cual sea la explicación, pensamos que la causa es la misma, un empeoramiento progresivo de la vasculatura pulmonar de los animales expuestos a hipoxia.

En los estudios realizados en las arterias pulmonares *in vitro*, mediante miografía, se observa un cambio acusado en las propiedades contráctiles de las arterias procedentes de ratas machos, con una respuesta vasoconstrictora a fenilefrina progresivamente mayor según el tiempo de exposición a HC, sin cambio aparente en las hembras. En la respuesta vasodilatadora a carbacol (dependiente del NO endotelial) se observa también una pérdida de respuesta sólo en las arterias de los machos expuestas a HC (figura 19B). Este hecho sugiere la aparición de disfunción endotelial inducida por hipoxia en las arterias pulmonares de machos.

El análisis mediante western blot de la expresión de eNOS muestra una ligera disminución de eNOS a los 7 días de HC en ambos sexos y un aumento significativo sólo en las hembras a los 15 días (figura 23). Estos datos van en la misma dirección que los cambios acaecidos en los niveles plasmáticos de NO, medidos como nitritos, de las ratas hembras (figura 25). En el mismo sentido, se observa también una disminución de L-arginina, el sustrato de la eNOS, en ambos sexos tras 7 días de HC. Se excluye un efecto competitivo sobre la eNOS por una mayor presencia del análogo metilado de la L-arginina, ADMA, puesto que no solo no aumenta sino que disminuye, excluyéndolo como causa en la disminución de NO (figura 24).

Aunque no tenemos explicación para todas las diferencias encontradas en este trabajo, una rápida mirada de los datos obtenidos en machos y hembras apuntan hacia una mayor susceptibilidad de las hembras para desarrollar hipertensión pulmonar de forma más rápida y generar unos parámetros cardíacos más afectados. Por el contrario, sus arterias pulmonares parecen encontrarse en mejor estado.

Una explicación a estas diferencias podemos encontrarla asumiendo un papel importante en los estrógenos presentes en las ratas hembras. Como ya hemos comentado en la introducción los estrógenos tienen múltiples lugares de acción y dianas. Los estrógenos pueden actuar a través de receptores en la membrana plasmática, en el citosol o en el núcleo. Una de las vías de señalización mejor estudiada es la activación de la cascada Src/Ras/ERK, un mecanismo de acción relacionado con los efectos proliferativos de los estrógenos y que podría explicar la hipertrofia ventricular y el remodelado vascular en la HAP<sup>24</sup>. Otro ejemplo de modulación por estrógenos es la homeostasis intracelular; se ha descrito que los estrógenos pueden aumentar o disminuir los niveles de calcio intracelular dependiendo del tipo celular.

Por último, un efecto importante de los estrógenos a nivel citosólico es la modulación de la disponibilidad de NO en las células vasculares. Este efecto de los estrógenos en la vasculatura se ha relacionado con el menor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria en las mujeres<sup>24</sup>. Sus efectos incluyen un aumento rápido en la producción de NO vasodilatador y la modulación de los canales iónicos de las células musculares lisas. Los estrógenos pueden activar la eNOS sin alterar su expresión en el endotelio vascular, un efecto que parece requerir la activación de receptores ER $\alpha$  y que involucra la activación de PI3K. Este efecto no se reproduce a través de los receptores ER $\beta$ , aunque ambas formas del receptor se expresan en las células vasculares<sup>24</sup>.

La existencia de varios mecanismos de acción para los estrógenos y de las diferentes afinidades de sus receptores puede explicar las acciones tan variadas, y en algunos casos contradictorias, del estradiol sobre las células vasculares.

## 6. CONCLUSIONES

1. La exposición a hipoxia crónica mantenida (11% O<sub>2</sub>) durante 7 y 15 días desarrolla hipertensión pulmonar en ratas de ambos sexos, pero de forma más rápida y acusada en hembras que en machos, sin cambios en su presión arterial sistémica.
2. En ratas de ambos sexos aparece hipertrofia ventricular derecha a los 7 días de exposición a HC y aumenta a los 15, pero de manera más significativa en hembras. Esta observación va acompañada de una disminución acusada de la frecuencia cardíaca en ratas hembras tras 15 días de HC.
3. La exposición a HC aumenta progresivamente la capacidad de contracción y disminuye la capacidad de relajación de las arterias pulmonares in vitro solo en ratas machos, sin cambio en las hembras. Estas observaciones sugieren la aparición de disfunción endotelial o remodelado del musculo liso vascular en machos.
4. Los estrógenos aplicados a las arterias pulmonares in vitro tienen un efecto vasodilatador en ambos sexos, efecto que aumenta tras 7 días de exposición a HC, pero que se normaliza a los 15 días de HC en las ratas hembras.
5. La expresión de la enzima e-NOS en las arterias pulmonares y los niveles plasmáticos de L-arginina y nitritos disminuyen a los 7 días de HC en ambos sexos, aunque de manera más significativa en las hembras. Dicho efecto podría estar compensado en las hembras por el efecto potenciador de los estrógenos sobre eNOS y NO.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Galiè, N. Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G. [Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension]. *Rev. Esp. Cardiol.* **58**, 523–66 (2005).
2. Subias, P. E., Mir, J. A. B. & Suberviola, V. Evaluación diagnóstica y pronóstica actual de la hipertensión pulmonar. *Rev. Esp. Cardiol.* **63**, 583–596 (2010).
3. Badesch, D. B., Abman, S. H., Simonneau, G., Rubin, L. J. & McLaughlin, V. V. Medical Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **131**, 1917–1928 (2007).
4. Naval, N. Epidemiología de la hipertensión pulmonar. *Insufic. Cardíaca* **5**, 192–196 (2010).
5. Ferrer, E. Peinado VI, Díez M, Carrasco JL, Musri MM, Martínez A, Rodríguez-Roisin R, Barberà JA. Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. *Respir. Res.* **10**, 76 (2009).
6. Peinado, V. I. Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, Rodríguez-Roisin R. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am. J. Physiol.* **274**, L908-913 (1998).
7. Ardite, E. Peinado VI, Rabinovich RA, Fernández-Checa JC, Roca J, Barberà JA. Systemic effects of cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Respir. Med.* **100**, 1186–1194 (2006).
8. Stenmark, K. R., Fagan, K. A. & Frid, M. G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* **99**, 675–691 (2006).
9. Olea, E. Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, Agapito T, Peinado V, Obeso A, Barbera JA, Gonzalez C. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on airways remodeling and resistance. Clinical significance. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **179**, 305–313 (2011).
10. Caramelo, C. Peña Deudero JJ, Castilla A, Justo S, De Solis AJ, Neria F, Peñate S, Gonzalez-Pacheco FR. [Response to hypoxia. A systemic mechanism based on the control of gene expression]. *Medicina (Mex.)* **66**, 155–164 (2006).
11. Olea, E. Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, Agapito T, Peinado V, Obeso A, Barbera JA, Gonzalez C. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on ventilation in guinea pigs. Clinical significance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **758**, 325–332 (2012).
12. Nicolls, M.R. & Voelkel, N. F. Hypoxia and the Lung: Beyond Hypoxic Vasoconstriction. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 741–743 (2007).
13. Cáneva, J. O., Rabec, C. A., De Salvo, M. C. & Mazzei, J. A. [Physiopathology, diagnosis and treatment of severe chronic hypoxemia. Role of residential chronic oxygen therapy]. *Medicina (Mex.)* **61**, 453–469 (2001).
14. Ferrer, E. Peinado VI, Castañeda J, Prieto-Lloret J, Olea E, González-Martín MC, Vega-Agapito MV, Díez M, Domínguez-Fandos D, Obeso A, González C, Barberà JA. Effects of cigarette smoke and hypoxia on pulmonary circulation in the guinea pig. *Eur. Respir. J.* **38**, 617–627 (2011).
15. Ma TT, Wang Y, Zhou XL, Jiang H, Guo R, Jia LN, Chang H, Gao Y, Yao XY, Gao ZM, Pan L. Research on rat models of hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **19**, 3723–3730 (2015).
16. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev. Oct*; **74**(4):829-98 (1994)

17. Delmonte, José A. Nueva clase de fármacos para la hipertensión arterial pulmonar y la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica. *Insuf Card.* vol.11 n.3 130-149. (2016)
18. Stenmark, K. R., Davie, N. J., Reeves, J. T. & Frid, M. G. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **98**, 715–721 (2005).
19. Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P. & Weiner, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* **184**, 409–420 (2000).
20. Le Cras, T. D. & McMurtry, I. F. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L575-582 (2001).
21. Ventetuolo, C. E. Praestgaard A, Palevsky HI, Klinger JR, Halpern SD, Kawut SM. Sex and haemodynamics in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **43**, 523–530 (2014).
22. Foderaro, A. & Ventetuolo, C. E. Pulmonary Arterial Hypertension and the Sex Hormone Paradox. *Curr. Hypertens. Rep.* **18**, 84 (2016).
23. Austin, E. D., Lahm T, West J, Tofovic SP, Johansen AK, Maclean MR, Alzoubi A, Oka M. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **3**, 294–314 (2013).
24. Nadal, A., Díaz, M. & Valverde, M. A. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* **16**, 251–255 (2001).