



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultad de Medicina. Departamento de Obstetricia y
Ginecología, Pediatría, Radiología y Medicina Física.**

**Efecto de los Isoprostanos en la Reactividad
Vascular Pulmonar y Sistémica durante el
Período Neonatal**

Tesis Doctoral: Gema E. González Luis

**Directores: Dr. Eduardo Villamor Zambrano
 Prof. Rafael Jiménez González**

Barcelona, 2005.

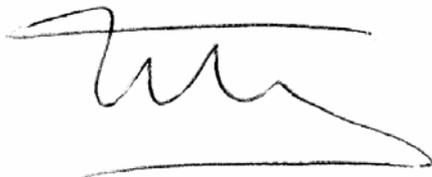
Dr. EDUARDO VILLAMOR ZAMBRANO, Profesor Asociado de Pediatría
del Hospital Universitario de Maastricht,

CERTIFICA:

Que **Gema Esther González Luis**

ha trabajado bajo mi dirección, la Tesis Doctoral sobre el tema: "**Efecto de los Isoprostanos en la Reactividad Vascular Pulmonar y Sistémica durante el Período Neonatal**" estando en condiciones de ser presentada para la obtención del grado de Doctor.

Lo que certifico en Maastricht a 14 de junio de 2005





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina
Departament de Pediatria

Prof. R. Jiménez
Catedràtic de Pediatria

Hospital Sant Joan de Déu
Passeig de Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat
Tel. 93 253 21 30
Fax 93 280 41 79
E-mail: rjimenez@medicina.ub.es

Prof. RAFAEL JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Catedrático de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA:

Que **Gema Esther González Luis**

ha trabajado bajo mi dirección, la Tesis Doctoral sobre el tema: "**Efecto de los Isoprostanos en la Reactividad Vascular Pulmonar y Sistémica durante el Período Neonatal**" estando en condiciones de ser presentada para la obtención del grado de Doctor.

Lo que certifico en Barcelona a 13 de junio de 2005

A mis padres...

AGRADECIMIENTOS:

- A Eduardo Villamor -mi profesor y amigo- por su gran paciencia y generosidad en la dirección de esta Tesis Doctoral.
- Al Prof. Jiménez, por no dudar en darme la oportunidad de presentar este proyecto.
- Al Prof. Blanco, al Prof. De Mey y a su grupo del laboratorio, por acogerme como a una más durante mi inolvidable estancia en Maastricht.
- Ana Sáez y Maite Guix por la ayuda inestimable en la gestión de documentos.
- A mis colegas del Servicio de Neonatología del H. Materno-Infantil de Canarias, por tolerar mis idas y venidas.
- A Xavier Krauel y a José Luis por ponerle color a la Tesis.
- A Remko Vreekamp, por demostrarme que el espacio que existe entre un sueño y su realidad es virtual. A este espacio lo llamamos... tiempo.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AII	Angiotensina II
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
ATII	Antitrombina II
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BK	Bradicinina
CAT	Catalasa
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio libre intracelular
cGK	Cinasa dependiente de GMPc
CMLV	Célula muscular lisa vascular
COX	Ciclooxigenasa
DAG	Diacilglicerol
DBP	Displasia broncopulmonar
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDRF	Factor relajante derivado de endotelio
ECE	Enzima conversora de endotelina
EC50	Concentración de fármaco necesaria para obtener el 50% del efecto máximo.
EC_{K10}	Concentración del fármaco que produce una respuesta contráctil equivalente al 10% de la respuesta contráctil inducida por el KCl.
EC_{K30}	Concentración del fármaco que produce una respuesta contráctil equivalente al 30% de la respuesta contráctil inducida por el KCl.
ECMO	Oxigenación con membrana extracorpórea
EGF	Factor de crecimiento endotelial
E_{max}	Efecto máximo
eNOS	Forma endotelial de la óxido nítrico sintetasa

ERK₁/ERK₂	Extracellular signal-regulated protein kinase
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET	Endotelina
ET A	Receptor de endotelina A
ET B	Receptor de endotelina B
EP	Receptor de prostaglandina E
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FiO₂	Fracción inspirada de oxígeno
FMN	Mononucleótido de flavina
FP	Receptor de prostaglandina F
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GTP	Trifosfato de guanosina
HPPN	Hipertensión pulmonar persistente neonatal
5HT	5-hidroxitriptamina o Serotonina
HAP	Hipertensión Arterial Pulmonar
HSP-90	Heat Shock Protein 90
HIV	Hemorragia intraventricular
iNOS	Forma inducible de la óxido nítrico sintetasa
IO	Índice de Oxigenación
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IP	Inositol fosfato
IP	Receptor de prostaglandina I
IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
K_{ATP}	Canales de K ⁺ dependientes de ATP
KPa	Kilopascales
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metiléster
LT (C₄, D₄)	Leucotrieno (C ₄ , D ₄)
MAPK	Cinasas de la proteína activadora del mitógeno
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina

NADPH	Fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina
NOS	Óxido nítrico sintetasa
nNOS	Forma neuronal de la óxido nítrico sintetasa
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Radical superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol [4,3-a]quinoxalin-1-ona
OH⁻	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
P_aCO₂	Presión arterial de CO ₂
PAF	Factor activador plaquetario
P_aO₂	Presión arterial parcial de O ₂
pD₂	Logaritmo negativo de EC50
PDE	Fosfodiesterasa
PDGF	Factor de crecimiento dependiente de plaquetas
PG	Prostraglandina
PIP₂	Fosfoinositol difosfato
PK (A,C)	Cinasa de la proteína (A, C)
PL (A,C)	Fosfolipasa (A, C)
ppm	Partes por millón
RN	Recién nacidos
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RVP	Resistencias vasculares pulmonares
ROP	Retinopatía del prematuro
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Nitroprusiato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TGFβ	Factor de crecimiento tumoral beta
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TX	Tromboxano
TP	Receptor del Tromboxano

U46619	9,11dideoxi-11 α ,9 α -epoximetano-prostaglandina F _{2α}
VPH	Vasoconstricción pulmonar hipóxica

Índice

	Página
A. INTRODUCCIÓN	15
1. El proceso de transición entre el patrón de circulación fetal y el neonatal	17
2. El fracaso del proceso de transición circulatoria: la HPPN	21
2.1 Concepto	21
2.2 Frecuencia. Prevalencia	22
2.3 Epidemiología	22
2.4 Bases fisiopatológicas	24
2.5 Diagnóstico	26
2.5.1 Clínico	
2.5.2 Exámenes complementarios	
2.6 Tratamiento	27
2.6.1 Medidas generales	
2.6.2 Medidas específicas	
2.6.3 Complicaciones	
2.7 Profilaxis	34
3. Mediadores vasoactivos implicados en la transición circulatoria y en la etiopatogenia de la HPPN	35
3.1 Óxido Nítrico (NO)	35
3.1.1 El NO como mediador vasoactivo	35
3.1.2 Mecanismo de acción de NO	37
3.1.3 NO en el pulmón perinatal	40
3.1.4 Influencia del NO en la etiopatogenia de la HPPN	44
3.1.5 El NO y el estrés oxidativo	46
3.2 Endotelina-1 (ET-1)	49
3.2.1 Características principales	49
3.2.2 ET-1 en el pulmón perinatal	51
3.2.3 ET-1 en la HPPN	52

	Página
3.3 Eicosanoides/Prostanoides	54
3.3.1 Definición, mecanismos de producción	54
3.3.2 Receptores de prostanoides	57
3.3.3 Eicosanoides en el pulmón perinatal	60
3.3.4 Eicosanoides e HPPN	61
3.4 Oxígeno	63
3.4.1 Características generales. Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica	63
3.4.2 Oxígeno y pulmón perinatal	65
3.4.3 Oxígeno e HPPN	66
3.4.4 Estrés oxidativo	68
4. ISOPROSTANOS: ¿Nuevos mediadores vasoactivos en la fisiología y patofisiología neonatal?	75
4.1 Definición, mecanismos de producción. Nomenclatura	76
4.2 Los isoprostanos como marcadores de estrés oxidativo	79
4.3 Isoprostanos y estados fisiológicos	80
4.4 Isoprostanos y enfermedad	81
4.4.1 Pulmonar	81
4.4.2 Enfermedad cardiovascular	82
4.4.3 Otras enfermedades	83
4.5 Isoprostanos en la fisiología y patofisiología perinatal	85
4.6. Biología vascular de los isoprostanos	86
4.6.1 Efectos vasculares de los isoprostanos	86
4.6.2 Vasos sistémicos	86
4.6.3 Vasos pulmonares	87
4.6.4 Receptores vasculares de los isoprostanos	89
4.6.5 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil a Isoprostanos	90
4.6.6 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante mediada por isoprostanos	93

	Página
B. HIPÓTESIS / OBJETIVOS	95
C. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS	101
1. Animales de experimentación	104
2. Obtención de los tejidos	105
3. Registro de la contractilidad vascular	106
3.1 Contracción	
3.2 Relajación	
4. Protocolos experimentales	110
4.1 Contracción	110
4.1.1 Estudio de la contracción vascular inducida por los isoprostanos	110
4.1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos	110
4.1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos	111
4.1.4 Papel del endotelio y de la vía de la COX en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos	111
4.2 Relajación	111
4.2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos	111
4.2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos	112
5. Fármacos y soluciones empleadas	112
6. Análisis estadístico de los resultados	114

	Página
D. RESULTADOS	119
1. Contracción	122
1.1 Respuesta contráctil a 8-iso PGE ₁ , 8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{1α} , 8-iso PGF _{1β} , 8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGF _{2β} y U46619 en el lechón recién nacido (12-24 horas) y de 2 semanas de edad.	123
1.1.1 Arteria pulmonar	123
1.1.2 Vena pulmonar	124
1.1.3 Arteria mesentérica	124
1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos.	155
1.2.1 Relajación mediada por SQ 29,548 (10 ⁻⁷ M) tras contracción inducida por los isoprostanos y por U46619.	155
1.2.2 Inhibición de la contracción inducida por los isoprostanos y por U46619 en presencia de SQ 29,548 (10 ⁻⁸ M).	155
1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos y por U46619.	167
1.4 Papel del endotelio y de la vía de la COX en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos	167
2. Relajación	193
2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos	193
2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos	193

	Página
E. DISCUSIÓN	201
1. Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias pulmonares	204
2. Efectos contráctiles de los isoprostanos en venas pulmonares	208
3. Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias mesentéricas	209
4. Isoprostanos y relajación	210
F. CONCLUSIONES	213
G. BIBLIOGRAFÍA	217

Introducción

A. INTRODUCCIÓN

1. El proceso de transición entre el patrón de circulación fetal y el neonatal

Durante la vida fetal, la función respiratoria y nutricional es llevada a cabo por la placenta. El feto presenta un patrón circulatorio en serie adaptado a esta situación y distinto del patrón circulatorio en paralelo propio de la vida postnatal (*Rudolf y Heymann, 1968*). Las dos características fundamentales, por tanto, de la circulación fetal son: la existencia de cortocircuitos derecha-izquierda y las elevadas resistencias vasculares en la circulación pulmonar (*Rudolf y Heymann, 1968; Cassin y cols., 1964; Abman, 1999*). La sangre de la placenta, saturada con oxígeno aproximadamente al 80%, llega al feto por la vena umbilical y fluye por el conducto venoso directamente hacia la vena cava inferior (**Figura 1**). Después de un corto trayecto en la vena cava inferior, donde la sangre placentaria se mezcla con la sangre desoxigenada que retorna de las extremidades inferiores, ésta desemboca en la aurícula derecha. Desde la aurícula derecha, un 25% de la sangre pasa por el foramen oval a la aurícula izquierda y un 75% pasa al ventrículo derecho. Un segundo cortocircuito derecha-izquierda se produce a través del ductus arteriosus presente entre la arteria pulmonar y la aorta. El mantenimiento de los dos cortocircuitos depende del gradiente de presión pulmonar-sistémico (*Rudolf y Heymann, 1968; Cassin y cols., 1964; Abman, 1999*).

En el momento del nacimiento y con las primeras respiraciones, el pulmón asume la función respiratoria llevada a cabo hasta entonces por la placenta. Al ligar el cordón, se produce el cese de la circulación umbilical que acabará produciendo la obliteración de la vena umbilical y del conducto venoso. El inicio de la respiración pulmonar provoca una caída brusca en las resistencias vasculares pulmonares (RVP) y los canales fetales del foramen oval y el ductus arterioso se cierran progresivamente (*Smith, 1998; Rudolf y Heymann, 1968; Cassin y cols., 1964; Abman, 1999*).

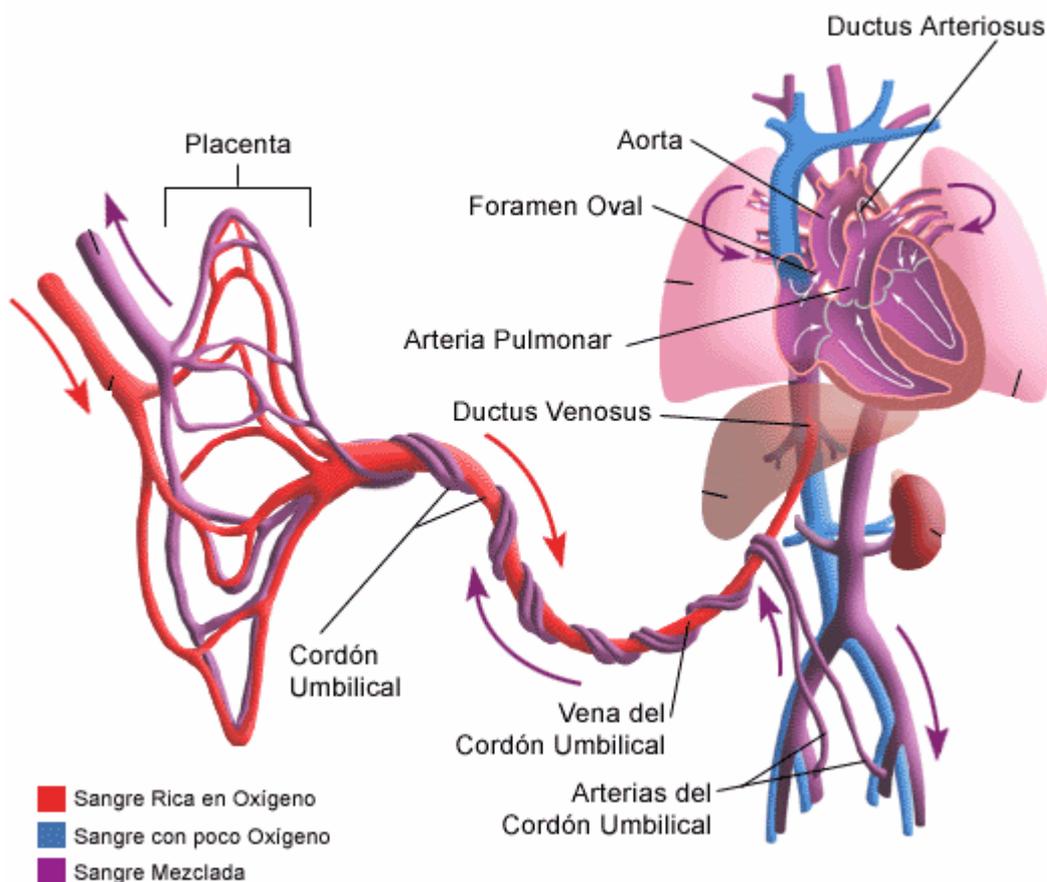


Figura 1. Esquema de la Circulación Fetal.

En el feto, el flujo pulmonar supone un 8% del gasto cardíaco. Tras el nacimiento, y con la caída en las resistencias vasculares pulmonares, este flujo se incrementa del orden de 8-10 veces (Heymann y cols., 1988). Son numerosos los factores que intervienen y no se sabe exactamente cuál es el determinante inmediato de la caída de las resistencias vasculares pulmonares. Las primeras respiraciones van a provocar una serie de cambios físicos tales como el drenaje del líquido pulmonar fetal, el establecimiento de una interfase aire-líquido, la distensión rítmica de los pulmones, el aumento de la PaO₂, la disminución de la PCO₂ y el incremento del flujo pulmonar con el consiguiente aumento del “shear stress” (Abman, 1999). Estos fenómenos físicos, bien por sí mismos, bien mediante la liberación de mediadores vasoactivos, van a producir el descenso en la presión arterial y el incremento del flujo sanguíneo pulmonar (Abman, 1999). El papel ponderado de cada uno

de ellos así como a través de qué mediadores actúan, ha sido el objeto de estudio de numerosos grupos de fisiólogos fetales y neonatales que han puesto de manifiesto la dificultad para comprender en su totalidad un proceso que sin duda alguna es multifactorial no sólo en sus causas genéricas sino también en las respuestas metabólicas que dichas causas provocan (Villamor, 2001; Blanco y cols., 1984, Ziegler y cols., 1995a; Abman, 1999; Heymann y cols., 1988) (**Figura 2**).

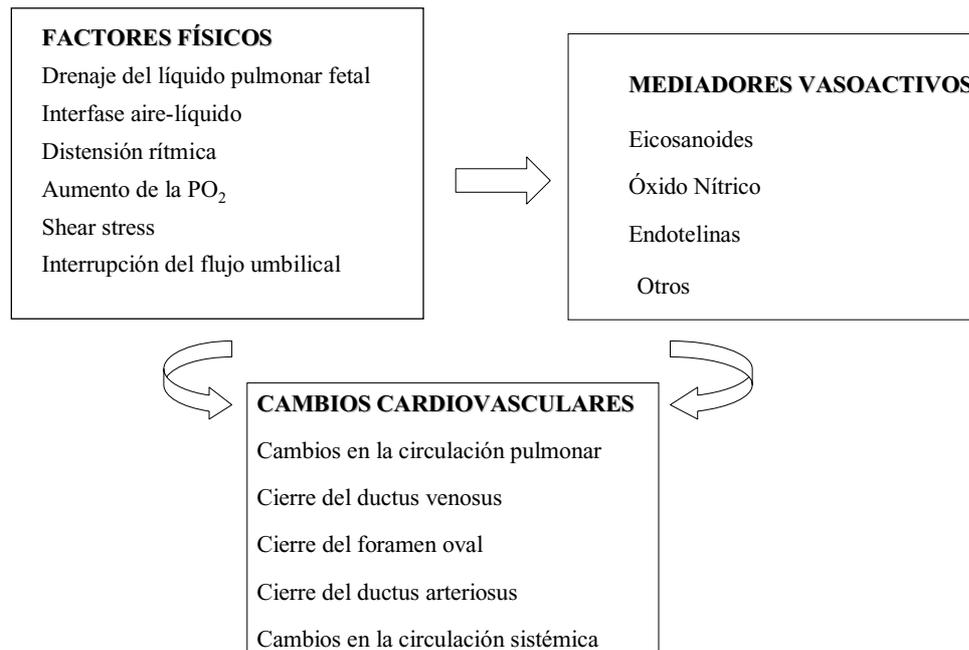


Figura 2. Factores implicados en el proceso de transición entre el período fetal y el neonatal.

La transición de la circulación pulmonar fetal a la neonatal se traduce tanto en cambios morfológicos: variaciones en la muscularización de las arterias (Haworth y Hislop 1981; Michel y cols., 1991), como funcionales: cambios en la respuesta contráctil frente a estímulos farmacológicos (Dunn y cols., 1989) y fisiológicos (Michel y cols., 1991; Zellers y Vanhoutte, 1991; Fineman y cols., 1991; Morin y cols., 1988; Gordon y cols., 1989). En algunas especies -como el cordero- la RVP alcanza valores de adultos en el plazo de horas (Abman, 1999). Sin embargo, en humanos y en cerdos, a las 24 horas postnatales ésta puede ser todavía el doble del valor del adulto. Un descenso más progresivo se apreciará durante las siguientes 3-6 semanas, como consecuencia del crecimiento de nuevos vasos y

de la involución del contenido muscular de las arterias pulmonares más distales (*Haworth y Hislop, 1981; Heymann y cols., 1989*).

Cuando la circulación pulmonar fracasa en su adaptación a la vida extrauterina, se origina el síndrome de hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN), una entidad clínica presente en varias alteraciones cardiopulmonares neonatales y que se caracteriza por un considerable aumento de las RVP después del nacimiento, originando un cortocircuito de derecha-izquierda de la sangre a través del ductus arteriosus y/o del foramen oval e hipoxemia severa (*Levin y cols., 1976*). La visión de la HPPN como fracaso de la transición circulatoria ha conducido a intensificar la investigación en la comprensión de este proceso, ya que el conocimiento de los mecanismos básicos de desarrollo funcional y estructural de la circulación pulmonar fetal y del proceso de transición, puede dar lugar a importantes avances fisiopatológicos y terapéuticos en la HPPN.

En los siguientes capítulos, analizaremos la HPPN desde un punto de vista clínico para posteriormente centrarnos en tres de las familias de mediadores vasoactivos –la vía óxido nítrico/guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico (NO/GMPc), las endotelinas y los eicosanoides- más ampliamente involucrados en la fisiología de la circulación pulmonar fetal y la fisiopatología de la HPPN. El papel del oxígeno en estos procesos será también analizado. Finalmente, dedicaremos un capítulo a los isoprostanos, compuestos biológicos cuyo posible papel fisiológico y patofisiológico pulmonar neonatal se desconoce y que son el grupo de mediadores vasculares en los que se centran los estudios de esta Tesis Doctoral.

2. El fracaso del proceso de transición circulatoria: la Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN)

2.1 Concepto

2.2 Frecuencia. Prevalencia

2.3 Epidemiología

2.4 Bases fisiopatológicas

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Clínico

2.5.2 Exámenes complementarios

2.6 Tratamiento

2.6.1 Medidas generales

2.6.2 Medidas específicas

2.6.3 Complicaciones

2.7 Profilaxis

2. El fracaso del proceso de transición circulatoria: la HPPN

2.1 Concepto

La Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN) es un síndrome caracterizado por cianosis central severa, que se debe a un cortocircuito derecha-izquierda a través de los canales fetales (ductus arteriosus y foramen oval) en ausencia de cardiopatía congénita subyacente (*Moro, 1995; Villamor, 2003b*).

La HPPN debe ser considerada no como una entidad única, sino como un grupo de enfermedades que tienen causas diversas, pero características comunes de presentación inicial. Las entidades clínicas que se asocian o pueden cursar con HPPN son muy numerosas (*Tabla 1*). Aunque muchos de los factores que se mencionan en la *Tabla 1* son a menudo considerados como agentes etiológicos de la HPPN (por ejemplo hipoglucemia o hipocalcemia) la evidencia sobre su efecto real, y que no se traten de meros epifenómenos

reflejo de la gravedad de la situación clínica, es pobre (Moro, 1995; Villamor, 2003b).

En la clasificación diagnóstica de la hipertensión pulmonar consensuada en el tercer simposio internacional sobre hipertensión arterial pulmonar (Rosenzewig y cols., 2004), se incluye la HPPN o Persistencia de la Circulación Fetal, como una de las formas de hipertensión arterial pulmonar (**Tabla 2**). Sin embargo, resultan indudables las características diferenciales entre el síndrome de HPPN y el resto de formas de hipertensión arterial pulmonar recogidas en dicha clasificación. De entrada, la hipertensión arterial pulmonar (HAP) se define –tanto en el niño como en el paciente adulto– como una presión arterial pulmonar >25 mmHg en reposo o >30 mmHg con el ejercicio (Rosenzewig y cols., 2004), mientras que como hemos comentado, la HPPN se define por la presencia de presiones arteriales pulmonares suprasistémicas que originan el cortocircuito derecha-izquierda.

2.2 Frecuencia. Prevalencia

En el único estudio epidemiológico prospectivo multicéntrico de la historia natural de la HPPN publicado hasta la fecha la prevalencia fue 1.9/1000 recién nacidos (RN) vivos (basada en 71.558 nacimientos) con un muy amplio rango (0.43-6.82/1000 RN vivos) entre los 12 centros terciarios incluidos en el estudio (Walsh-Sukys y cols., 2000). Este estudio ha sido realizado en los EE.UU. pero al carecer de datos epidemiológicos de calidad en España o los países de nuestro entorno cercano lo utilizaremos como fuente fundamental.

2.3 Epidemiología

Sólo un 17% de los casos fueron catalogados como idiopáticos en el estudio de Walsh-Sukys y cols. (2000). En los demás la HPPN se asoció a síndrome de aspiración meconial (41%), neumonía (14%), síndrome de distrés respiratorio (13%), neumonía o síndrome de distrés respiratorio indistinguibles (14%), hernia diafragmática (10%) o hipoplasia pulmonar (4%). La supervivencia global fue del 88% (rango 67-96%). La supervivencia varió entre el 94% en los RN con HPPN asociada a síndrome de aspiración meconial, el 91% para la HPPN asociada a neumonía o síndrome de distrés respiratorio o el 61% en la HPPN asociada a hernia diafragmática.

Tabla 1. Factores asociados con HPPN (modificado de *Roberts y cols., 1997*)

<p>Pulmonares</p> <p>Aspiración meconial Aspiración hemática Enfermedad de membrana hialina Deficiencia de surfactante Taquipnea transitoria del RN Hernia diafragmática Malformación adenomatoidea quística Hipoplasia pulmonar Neumonía Tromboembolismo Oclusión vascular pulmonar periférica Displasia alveolocapilar Hemorragia pulmonar Agenesia del nervio frénico</p> <p>Sepsis</p> <p>Estreptococo del grupo B <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Otros</p> <p>Metabólicos</p> <p>Hipoglucemia Hipocalcemia Acidosis Hipoxia</p>	<p>Hematológicos</p> <p>Policitemia Trombocitopenia Endocarditis thrombótica Hemorragia aguda</p> <p>Gastrointestinales</p> <p>Onfalocele Perforación Gastrosquisis</p> <p>Ambiente intrauterino adverso</p> <p>Hipoxia crónica Postmaduridad Cierre ductal Hipoxia, hemorragia, hipotensión maternas</p> <p>Fármacos maternos</p> <p>Aspirina Indometacina Naproxeno Hidantoínas Amitriptilina Litio Terbutalina Tabaco</p> <p>Otros</p> <p>Idiopática Hipertensión sistémica Shock Distensión de la arteria pulmonar</p>
--	---

2.4 Bases fisiopatológicas

Desde un punto de vista fisiopatológico se pueden diferenciar, en base a la anatomía del lecho vascular, las situaciones en las que existe una disminución del número de vasos (hipoplasia vascular generalmente asociada a hipoplasia pulmonar) o un exceso de musculatura lisa vascular, de las situaciones en las que, siendo inicialmente normales los vasos, se produce una adaptación deficiente al patrón circulatorio extrauterino (*Abman, 1999; Villamor, 2003b*). A este último grupo se circunscriben la mayor parte de los casos de HPPN. La adaptación defectuosa acompaña frecuentemente al estrés perinatal agudo, como asfixia, infección o síndrome de aspiración meconial. Estas entidades se caracterizan por la liberación de mediadores vasoactivos locales, fundamentalmente óxido nítrico (NO), eicosanoides y endotelinas. La alteración del equilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras juega un papel relevante en la génesis del trastorno pulmonar (*Villamor y cols., 1999; 2003b; Moro y cols., 1995*). Pero además los vasos pulmonares neonatales se caracterizan por presentar respuestas vasoconstrictoras mayores que los del adulto. Es más, una vez que se induce la vasoconstricción, ésta suele persistir aunque se elimine el elemento desencadenante. Por otra parte, los vasos pulmonares del feto y el RN, presentan una capacidad singular para mostrar cambios rápidos en su arquitectura. En particular, destaca su capacidad para la hipertrofia de la capa muscular (*Haworth y Reid, 1976; Haworth y Hislop, 2003*). La formación anormal de músculo en las arterias pulmonares puede ocurrir antes o después del nacimiento y ser activada por múltiples estímulos como la hipoxia, el aumento de la presión pulmonar, el aumento del flujo pulmonar o el daño endotelial (*Haworth y Reid, 1976; Haworth y Hislop, 2003*). Por otra parte, los factores vasoactivos previamente referidos van a presentar también capacidad pro o antimitótica sobre el músculo liso vascular. Las alteraciones en la respuesta vascular y el remodelado estructural se traducen en una secuencia en la que la vasoconstricción induce cambios estructurales que a su vez producen alteraciones en la respuesta vascular (*Abman, 1999; Villamor y cols., 1999; Moro y cols., 1995*).

Como hemos referido, la HPPN se asocia con frecuencia a patologías pulmonares como la aspiración meconial, la neumonía o la enfermedad de membrana hialina. El cortocircuito intrapulmonar en estas entidades puede complicar la evolución y la respuesta a determinadas terapéuticas. Además, las alteraciones en la función miocárdica, con

disminución en el gasto ventricular izquierdo, o las alteraciones en los vasos sistémicos pueden provocar hipotensión sistémica con la consiguiente exacerbación del cortocircuito derecha-izquierda (*Abman, 1999; Villamor y cols., 1999; Moro y cols., 1995*).

Tabla 2. Clasificación Diagnóstica de la Hipertensión Pulmonar (Third World Symposium: Pulmonary Arterial Hypertension, 2003)

<p>Hipertensión arterial pulmonar (PAH)</p>	<p>.Esporádica (IPAH) .Familiar (FPAH) .Relacionada con: -Enfermedad del tejido conjuntivo -Cardiopatía congénita -Hipertensión portal -Infección por HIV -Fármacos y tóxicos -Otros: Glucogenosis tipo I, enfermedad de Gaucher, hemoglobinopatías, trastornos mieloproliferativos, telangiectasia hemorrágica hereditaria (Rendu-Osler-Weber) .Hipertensión arterial pulmonar con alteración significativa venular y/o capilar -Enfermedad pulmonar veno-oclusiva Esporádica Familiar -Hemangiomas capilar pulmonar .Persistencia de la circulación fetal (HPPN)</p>
<p>Hipertensión pulmonar venosa</p>	<p>.Obstrucción venosa pulmonar (discreta) .Enfermedad de corazón izquierdo</p>
<p>Hipertensión pulmonar asociada con trastornos del sistema respiratorio o hipoxemia</p>	<p>.Enfermedad de membrana hialina .Displasia broncopulmonar .Hernia diafragmática congénita .Hipoplasia pulmonar .Displasia alveolo-capilar .Fibrosis quística .Enfermedad pulmonar obstructiva crónica .Enfermedad pulmonar intersticial .Trastornos respiratorios del sueño .Trastornos de hipoventilación alveolar .Exposición crónica a la altura</p>
<p>Hipertensión pulmonar debida a enfermedad tromboembólica</p>	<p>.Obstrucción tromboembólica de las arterias pulmonares proximales .Obstrucción tromboembólica de las arterias pulmonares distales .Embolismo pulmonar (tumor, parásitos, cuerpo extraño)</p>
<p>Miscelánea</p>	<p>.Sarcoidosis .Histiocitosis X .Mediastinitis Fibrosante .Adenopatías y tumores .Linfangiomas</p>

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Clínico

Se establecerá el diagnóstico de sospecha clínica ante aquel RN con hipoxemia severa y labilidad en la oxigenación que no responden a la administración de altas concentraciones de oxígeno. El diagnóstico diferencial con cardiopatías congénitas cianósicas estará por tanto siempre presente. En numerosas ocasiones van a poderse identificar en la historia alguna de las entidades (aspiración meconial, asfixia, sepsis) a las que se asocia la HPPN. Los test de hiperventilación manual para diferenciar la HPPN de una cardiopatía congénita se han abandonado generalmente debido al riesgo de baro-volutrauma y a la disponibilidad cada vez mayor de ecocardiografía de manera inmediata. La utilización de pulsioximetría o monitorización transcutánea de PO_2 de modo simultáneo en los territorios pre y post-ductal puede ayudar a establecer un diagnóstico de sospecha si el cortocircuito derecha-izquierda se produce a nivel ductal (*Villamor, 2003b*).

2.5.2 Exámenes complementarios

Aunque la ecocardiografía doppler se ha convertido en gran medida en el patrón oro para el diagnóstico de HPPN, ningún método ha sido evaluado prospectivamente para determinar su sensibilidad y especificidad (*Walsh-Sukys y cols., 2000*).

La *gasometría* muestra la hipoxemia severa (PaO_2 5-6 KPa, 37.5-45 mmHg, con $FiO_2 = 1$) y generalmente acidosis grave. La determinación simultánea de gasometrías preductales (generalmente de la arterial radial derecha) y postductales (generalmente de la arteria umbilical) permite objetivar el cortocircuito izquierda-derecha si este ocurre a nivel ductal (diferencia entre la PaO_2 preductal y la postductal superior a 1-2 KPa, 7.5-15 mmHg) (*Villamor, 2003b*). La *radiología* pondrá de manifiesto, en el caso de HPPN secundaria a enfermedad pulmonar, la patología subyacente y permitirá evaluar la gravedad de ésta. En la HPPN primaria las alteraciones en la radiografía de tórax van a ser en general mínimas pudiendo mostrar una vascularización pulmonar disminuida o la

presencia de cardiomegalia (*Villamor, 2003b*).

El trazado *electrocardiográfico* es en ocasiones normal y en otras pone de manifiesto hipertrofia derecha. En los RN con HPPN secundaria a asfixia severa el electrocardiograma puede mostrar anomalías de la onda T y del ST que sugieren isquemia miocárdica.

Como ya hemos referido, la *ecocardiografía* es en la actualidad el método no invasivo más útil en el diagnóstico de la HPPN. Por un lado permite descartar la presencia de malformaciones cardiacas que forman parte del diagnóstico diferencial y por otra parte permite la visualización del cortocircuito derecha-izquierda mediante la utilización del doppler.

El *cateterismo cardiaco* muy rara vez se utiliza para el diagnóstico de HPPN por su carácter invasivo y técnicamente dificultoso (la presencia de los flujos del cortocircuito dificultan la cateterización de la arteria pulmonar).

2.6 Tratamiento

El tratamiento de la HPPN irá encaminado a lograr la disminución de las resistencias vasculares pulmonares, el mantenimiento de una tensión arterial sistémica adecuada, la disminución del cortocircuito derecha-izquierda, la mejora de la oxigenación arterial y de la liberación de oxígeno a los tejidos. Si los objetivos del tratamiento parecen muy claros no puede decirse lo mismo de la manera de conseguir éstos. El tratamiento óptimo del síndrome de HPPN es objeto de controversia. De los numerosos tratamientos propuestos tan sólo el NO inhalado y la oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO) han sido evaluados mediante estudios prospectivos, controlados (*Walsh-Sukys y cols., 2000*). A pesar de ello numerosas prácticas como la hiperventilación, la alcalinización, la sedación, la parálisis neuromuscular, el uso de surfactante, de agentes inotrópicos o vasodilatadores intravenosos constituyen la pauta habitual en numerosas unidades de cuidados intensivos neonatales.

2.6.1 Medidas generales

-Evitar al máximo la manipulación que puede precipitar crisis de hipoxemia incluso en respuesta a mínimos estímulos como la toma de temperatura o un cambio en la posición del niño. Maniobras de mayor agresividad como la succión del tubo endotraqueal o la punción arterial pueden tener efectos altamente deletéreos (*Villamor, 2003b*).

-Evitar la acidosis y el enfriamiento ya que pueden aumentar la vasoconstricción pulmonar. Corregirlas cuando sea necesario

-Corrección de las posibles alteraciones hidroelectrolíticas y metabólicas prestando particular atención a la hipocalcemia y la hipoglucemia. Corregir los posibles trastornos de la coagulación.

2.6.2 Medidas específicas

Hiperventilación. Ventilación de alta frecuencia

La hiperventilación es todavía una de las piedras angulares del tratamiento de la HPPN a pesar de la ausencia de estudios con diseños adecuados para demostrar su eficacia y seguridad (*Heymann y cols., 1984; John y cols., 1988*). Se basa en la idea de la consecución de una PCO_2 crítica, generalmente por debajo de 3.5 KPa (26 mmHg), con la consiguiente alcalosis respiratoria que tendría efectos vasodilatadores pulmonares (*Walsh-Sukys y cols., 2000*). La hiperventilación requiere el uso de volúmenes tidales elevados y frecuencias altas lo que trae consigo el riesgo de atrapamiento de gas con sobredistensión alveolar, aumentando la posibilidad de escape aéreo. Por otra parte la sobredistensión pulmonar determina un aumento de la presión intratorácica lo que reduce el retorno venoso y el flujo sanguíneo pulmonar empeorando las condiciones hemodinámicas de estos pacientes (*Villamor, 2003b*). Además, la hipocapnia prolongada ha sido asociada con alteraciones en el desarrollo neurológico, probablemente debido a sus efectos de disminución del flujo sanguíneo cerebral.

La utilización en los últimos años de la ventilación de alta frecuencia ha posibilitado,

al menos desde un punto de vista teórico, lograr la hiperventilación con una menor agresividad ventilatoria. Sin embargo, y aún a riesgo de ser reiterativos insistiremos en la ausencia de evidencia científica que soporte una ventaja, que vaya más allá de la mejora aguda de la oxigenación, de la ventilación de alta frecuencia frente a la convencional en el manejo de la HPPN (*Walsh-Sukys y cols., 2000*).

Alcalosis metabólica

Su utilización se basa en la idea, controvertida incluso en experimentación animal, de que el efecto vasodilatador pulmonar es debido al pH elevado independientemente de que la alcalosis se obtenga por la ruta respiratoria (hiperventilación) o metabólica (administración de bicarbonato sódico) (*Villamor, 2003b*). No existe evidencia científica en torno a la alcalinización metabólica e incluso el estudio observacional de Walsh-Sukys y cols. (2000) señala que las dos rutas de alcalinización no son equivalentes y que el uso de álcalis se asociaría con peores resultados.

Sedación. Parálisis neuromuscular

La extrema labilidad y vulnerabilidad de estos niños frente a los estímulos externos hacen casi obligado el uso de sedantes como morfina o fentanilo (*Villamor, 2003b*).

La utilización de agentes bloqueantes neuromusculares como pancuronio o D-tubocuranina se realiza en general asociada a hiperventilación y con el fin de permitir ésta (*Runkle y cols., 1984*). No existe evidencia que soporte su uso e incluso, en el estudio observacional de Walsh-Sukys y cols. (2000), se ha asociado con un incremento de mortalidad.

Inotrópicos

Como hemos mencionado previamente, el mantenimiento de una tensión arterial sistémica adecuada es uno de los objetivos del tratamiento al depender la intensidad del cortocircuito derecha-izquierda, de la diferencia en presión arterial entre los dos circuitos. Por tanto el mantenimiento de un volumen intravascular adecuado mediante coloides o cristaloides y la utilización de aminas simpaticomiméticas (dopamina, dobutamina, isoproterenol) con el fin de mejorar el gasto cardiaco forman parte habitual de las pautas terapéuticas de la HPPN (*Walsh-Sukys y cols., 2000; Villamor, 2003b*).

Surfactante

En algunas de las patologías que asocian HPPN (síndrome de distrés respiratorio, aspiración meconial) el déficit de surfactante juega un papel central y su uso es soportado por evidencia científica (*Soll y Dargaville, 2000*). En otras formas de HPPN el uso de surfactante debe ser considerado como una terapia experimental.

Vasodilatadores intravenosos

Hasta la llegada del NO inhalado numerosos vasodilatadores incluyendo tolazolina, prostaciclina, prostaglandina D₂, sulfato de magnesio o ATP-MgCl₂ han sido utilizados, o continúan siendo usados, en el tratamiento de la HPPN debido a sus teóricos efectos selectivos sobre el lecho vascular pulmonar (*Pérez-Vizcaíno y cols., 1996b*). El principal problema para la utilización de estos fármacos es su efecto sobre la circulación sistémica. Todos ellos producen, en mayor o menor medida, vasodilatación sistémica lo que mantiene el cortocircuito derecha-izquierda a pesar de la disminución de las resistencias vasculares pulmonares. No existe, hasta el momento presente, evidencia científica que soporte la utilización de ninguno de los fármacos previamente mencionados (*Walsh-Sukys y cols., 2000*).

Vasodilatadores inhalados

El metanálisis de *Finer y Barrington (2000)* que recoge ocho estudios con asignación aleatoria de controles pone de manifiesto que: “parece razonable el uso de NO inhalado en concentraciones de 20 ppm en RN > 34 semanas con HPPN o fallo respiratorio hipóxico no producidos por una hernia diafragmática” (*Figueras y cols., 1998; 2001*). Otros vasodilatadores propuestos, de modo experimental, para su uso por vía inhalatoria o endotraqueal serían la prostaciclina, el nitroprusiato sódico y la tolazolina (*Mestan y cols., 2003*).

Óxido Nítrico Inhalado:

La utilidad clínica del NO radica en que al caer la presión en la arteria pulmonar, disminuye el cortocircuito derecha-izquierda, por lo que aumenta el flujo pulmonar, mejora el intercambio gaseoso y reduce la hipoxemia (*Abman y cols., 1994; Figueras y cols., 2001; 2003; Roze y cols., 1994*). Además, inhibe la proliferación celular, disminuyendo el remodelado vascular y por tanto, la cronicidad del cuadro clínico

(Roberts y cols., 2000). En el estudio NINOS se demostró la efectividad del NO inhalado en los neonatos con hipertensión pulmonar persistente idiopática y sepsis/neumonía, siendo menor en los afectos de aspiración meconial e inútil en la membrana hialina (NINOS, 1997). El NO inhalado mejora la evolución en recién nacidos hipoxémicos a término o casi-términos, puesto que reduce la necesidad de ECMO, aunque no disminuye la mortalidad de forma significativa (Finer y Barrington, 2001). Las indicaciones de tratamiento vienen definidas por el Grupo de Respiratorio Neonatal de la Sociedad Española de Neonatología y por el Consenso Europeo para este propósito (Figueras y cols., 2001; Macrae y cols., 2004). Al margen del uso relacionado por cardiopatías congénitas, comentamos a continuación las indicaciones de causa respiratoria:

1. Edad gestacional ≥ 35 semanas. En prematuros menores de 35 semanas, no existe evidencia científica de su seguridad (Barrington y Finer, 2001) y en éstos se utilizan dosis bajas de 5 ppm de NO inhalado en situaciones de hipoxemia grave (Kinsella, 1999).

2. Diagnóstico de HPPN mediante la clínica (PaO_2 postductal <60 mmHg, gradiente de PaO_2 pre-postductal superior a 15 mmHg o gradiente de Sat Hb pre-postductal superior a 5%) y/o ecocardiografía Doppler (shunt ductal y/o auricular derecha a izquierda o bidireccional). Previamente se habrá corregido la hipotensión arterial, asincronía con el respirador, anemia aguda, poliglobulia, hipotermia, hipoglucemia, hipocalcemia, acidosis metabólica, neumotórax, atelectasias e hiperinsuflación pulmonar.

3. Índice de oxigenación ($\text{IO} = \text{Presión Media Vías Aéreas} * \text{FiO}_2 * 100 / \text{PaO}_2$ postductal) ≥ 25 en dos controles sucesivos separados 30 minutos. Algunos autores prefieren un IO entre 15-20 ya que una administración más precoz del NO inhalado puede obtener mejores resultados, evitar un mayor deterioro clínico del paciente y facilitar un posible traslado a un centro dotado con alta tecnología.

4. Presencia de una hipoxemia grave rebelde ($\text{IO} \geq 25$), aunque no exista evidencia de hipertensión pulmonar persistente.

Para un correcto uso del fármaco, se precisa además de un adecuado reclutamiento alveolar, un sistema de administración específico recientemente incorporado a la industria farmacológica, así como monitorización continua de NO/NO₂. El Consenso Europeo para el tratamiento con NO inhalado (Macrae y cols., 2004), recomienda en caso de transporte de un centro a otro, el uso de los sistemas disponibles comercialmente y específicamente diseñados para este cometido (Kinsella y cols., 2002)

En la clínica se utilizan concentraciones en torno a 5 a 20 ppm (se recomienda utilizar la dosis mínima eficaz) (*Finer y cols., 1994, 2001; Kinsella y cols., 1997a, 1997b; Laubscher y cols., 1997; Zayek y cols., 1993*) manteniendo siempre la fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) por encima del 90%, aunque la respuesta es individual en cada caso (*Kinsella y Abman 1995; Turbow y cols., 1995; Goldman y cols., 1996*). Los autores de la revisión Cochrane, concluyen en que los recién nacidos a término o casi-terminos que presenten fallo respiratorio hipoxémico que no responda a la terapia habitual, excluyendo el grupo con hernia diafragmática, deberían ser tratados con NO inhalado a 20 ppm (*Finer y Barrington, 2001*). Se considera mal respondedor aquel neonato en el que tras dos horas de administración del NO, la PaO_2 postductal no asciende 20 mm Hg. Ante una mala respuesta, se debe disminuir el NO de forma progresiva y lenta hasta retirarlo (*Figueras, 2003*).

Por el contrario, en los respondedores, se debe iniciar el descenso tras cuatro horas de estabilización hasta alcanzar la mínima dosis eficaz (próxima a 5 ppm y que puede llegar a 1 ppm). Se retirará el NO inhalado cuando la fracción inspiada de oxígeno (FiO_2) sea menor del 60% y al interrumpirlo no se produzca un incremento de la presión arterial pulmonar, ni un efecto rebote con necesidad de aumentar la FiO_2 más del 15% con respecto al valor previo. Su descenso en la fase de mejoría se llevará a cabo lentamente para evitar situaciones de hipoxia severa (de 1 en 1 ppm). Si al ir disminuyendo, empeora notablemente la oxigenación, se volverá a la situación previa y se intentará de nuevo el descenso pasadas 24 horas (*Figueras, 2003*). Se requiere monitorización de metahemoglobina diaria en sangre, para procurar mantener niveles inferiores a 2%. Se deberá ajustar inmediatamente la administración de NO inhalado si se detecta un aumento de $NO_2 > 5$ ppm, aunque sería prudente que los niveles fueran siempre inferiores a 1,5 ppm o metahemoglobinemia $> 2,5\%$. Se recomienda de igual forma monitorizar continuamente los niveles de NO_2 ambiental por si ocurriera un escape de forma accidental de NO desde los cilindros de administración (*Macrae y cols., 2004*).

A pesar de lo referido acerca de su toxicidad potencial, el NO es considerado un fármaco seguro a corto plazo, aunque son necesarios más estudios para determinar correctamente sus efectos a largo plazo (*Abman y Kinsella, 1995*). Tan sólo en los recién nacidos cardiopatas con coartación de aorta postductal o con hipoplasia de ventrículo izquierdo, en

los que el flujo sanguíneo sistémico depende del cortocircuito derecha-izquierda a través del ductus arteriosus, la administración de NO inhalado puede producir un deterioro clínico agudo al invertir la dirección del cortocircuito. En el estudio NINOS se demuestra que los niños que recibieron NO inhalado, no presentan un mayor riesgo a largo plazo de secuelas en el neurodesarrollo y tampoco más complicaciones pulmonares una vez han sido dados de alta (*NINOS, 1997*).

Experimentalmente se ha demostrado que el NO prolonga el tiempo de hemorragia y posee actividad antiagregante plaquetaria (*Radomski 1993; Geggel y cols., 1993; Greenough y cols., 2000*). Por ello, aunque clínicamente no se ha demostrado una mayor incidencia de hemorragias intracraneales tras la administración de NO por vía inhalatoria en los recién nacidos pretérmino (ya de por sí especialmente susceptibles a cualquier tipo de sangrado por su condición de inmadurez), su práctica en el momento actual no está del todo generalizada (*Kinsella y cols., 1999; Sánchez-Esteban, 2003*). Barrington y Finer (*2001*), tras una amplia revisión en recién nacidos menores de 35 semanas, concluyen que la evidencia no apoya el uso de NO inhalado en prematuros con insuficiencia respiratoria hipoxémica, aunque puede que exista una reducción en la severidad de la enfermedad pulmonar crónica en relación a un acortamiento en la duración de la ventiloterapia.

ECMO

La oxigenación por membrana extracorpórea constituye el último recurso de tratamiento en recién nacidos con HPPN que no responden a la terapia. Las indicaciones de uso se deben individualizar en el contexto de la gravedad de la enfermedad o la velocidad de deterioro según el paciente. Los sistemas de ECMO pueden dividirse en venoarteriales y venovenosos. La mayor limitación del empleo de ECMO venoarterial es la canulación de la arteria carótida y sus complicaciones. El empleo de una vía única venosa evita estas complicaciones, por lo que resulta más usado el venovenoso. Los criterios de selección así como las contraindicaciones de uso son estrictos (*Collaborative ECMO Trail Group, 1996; Sánchez Luna y cols., 2002*).

Otros tratamientos experimentales

Se han propuesto y utilizado en modelos animales o anecdóticamente en pacientes, los inhibidores de fosfodiesterasas (dipiridamol, zaprinast, sildenafil) para aumentar el efecto vasodilatador del NO inhalado (*Travadi y Patole, 2003*). También la superóxido

dismutasa ha sido propuesta con el fin de aumentar el efecto y disminuir la posible toxicidad del NO inhalado debido al carácter de radical libre de éste (*Steinhorn y cols., 2001*). Debido a la relación entre la HPPN asociada a sepsis, particularmente a *Estreptococo del grupo B*, y la presencia de niveles elevados de tromboxano A₂ (TXA₂) se han ensayado, en modelos experimentales, los inhibidores de su síntesis como el dazmagrel (*Meadow y Rudinsky, 1995*). Finalmente, también los fármacos que actúan sobre la vía de la endotelina-1 (concretamente antagonistas para los receptores A de endotelina) han demostrado su eficacia en modelos experimentales de hipertensión pulmonar (*Ivy y cols., 1997*).

2.6.3 Complicaciones

Como consecuencia de la agresividad en la ventilación mecánica los síndromes de escape aéreo y el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica son complicaciones frecuentes. El RN pretérmino con HPPN acompañada de hipoxemia severa y muy frecuentemente de hipotensión es un claro candidato a presentar hemorragia intracraneal o leucomalacia periventricular particularmente tras el uso de hipocapnia (*Walsh-Sukys y cols., 2000*). Como secuela tardía de la HPPN se describe una alta incidencia de pérdida de audición por lo que conviene analizarla a los 6-8 meses del alta.

2.7 Profilaxis

Una revisión realizada en 1996 de la base de datos Oxford de estudios perinatales pone de manifiesto la ausencia de estudios controlados que demuestren la prevención de la HPPN mediante ninguna intervención prenatal (*Finner y Barrington, 2001*). Debido al hecho de la frecuente asociación de HPPN con síndrome de aspiración meconial, neumonía, sepsis o síndrome de distrés respiratorio, las medidas encaminadas a la profilaxis de estas entidades tendrían una incidencia positiva en la prevención de la HPPN (*Villamor 2003b*).

3.- Mediadores vasoactivos implicados en la transición circulatoria y en la etiopatogenia de la HPPN.

3.1 Óxido Nítrico

3.2 Endotelina

3.3 Eicosanoides

3.4 Oxígeno

3.1 Óxido Nítrico (NO)

3.1.1 El NO como mediador vasoactivo

3.1.2 Mecanismo de acción de NO

3.1.3 NO en el pulmón perinatal

3.1.4 Influencia del NO en la etiopatogenia de la HPPN.

3.1.5 El NO y el estrés oxidativo

3.1.1 El NO como mediador vasoactivo

En el año 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que el efecto vasodilatador de la acetilcolina (Ach) dependía de la presencia del endotelio vascular y propusieron la existencia de lo que entonces denominaron “factor relajante derivado del endotelio” (EDRF). Luego, Ignarro y cols. (1987) y Palmer y cols. (1987), por separado, identificaron el EDRF como NO.

El NO es un potente vasodilatador endógeno, inhibidor de la agregación y de la adhesión plaquetaria, neurotransmisor y que además de intervenir en la regulación de diferentes acciones del organismo, posee implicaciones terapéuticas en muchos sistemas.

El NO se forma a nivel endógeno por medio de un grupo de enzimas conocido como las NO sintetasas (NOS), de las que se han identificado, hasta el momento, al menos tres isoformas (*Moncada y cols., 1997*):

1.- Forma Neuronal o nNOS o NOS I. Su actividad se regula por el calcio y la calmodulina. Se encuentra en el SNC y periférico, además de entre otros lugares, en el epitelio bronquial y de la tráquea (*Kobzik y cols., 1993*) y en el músculo esquelético (*Kobzik y cols., 1993*) y liso.

2.- Forma Inducible o iNOS o NOS II: independiente del calcio. Se aísla de varios tipos celulares tras el estímulo de mediadores inflamatorios y productos bacteriológicos. También están en el epitelio bronquial humano (*Kobzik y cols., 1993*), epitelio del riñón de rata (*Mohaupt y cols., 1994*) y tejido pulmonar ovino (*Rairigh y cols., 1998*).

3.- Forma endotelial o eNOS o NOS III: también dependiente del calcio. Se encuentra, entre otros lugares, en las células endoteliales vasculares, en las plaquetas (*Radomski y cols., 1990*) y en ciertas poblaciones neuronales en el cerebro (*Dinerman y cols., 1994*).

La asociación de los tres isoenzimas de la NO sintetasa con el endotelio (eNOS), las neuronas (nNOS) y la inducibilidad (iNOS), no deja de ser una simplificación que se basa en el primer lugar donde fueron aisladas (*Moncada y cols. 1997*). Así, hemos mencionado que, por ejemplo, la eNOS se localiza en otros tejidos no endoteliales y la nNOS en tejidos no neurales. Es más, la eNOS puede ser inducida por determinados estímulos como el ejercicio (*Sessa y cols., 1994*) o la gestación (*Weiner y cols., 1994*) y la iNOS, por el contrario, puede aparecer de forma constitutiva en algunos tejidos (*Rairig y cols., 1998*).

El NO que se libera de las células endoteliales lo hace en respuesta a fuerzas físicas de cizallamiento o de presión y a diversos agonistas como la ACh, la bradicinina (BK), las catecolaminas, la antitrombina II (ATII), la endotelina-1 (ET-1), la vasopresina, la trombina, el adenosín trifosfato (ATP) y el ácido araquidónico entre otros. La NOS produce una oxidación del grupo guanidino terminal de la L-arginina (*Palmer y Moncada 1989*). La reacción es dependiente del O₂ y del fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) y da lugar a NO y L-citrulina (*Bush y cols., 1992*). Además, para que se lleve a cabo esta reacción, se requiere la presencia de otros cofactores: Flavín adenin dinucleótido (FAD) (*Stuehr y cols., 1990*), Flavín mononucleótido (FMN) (*Mayer y cols., 1991*) y Tetrahidrobiopterina (BH₄) (*Mayer y cols., 1991*).

3.1.2 Mecanismos de acción de NO

La mayor parte de las acciones fisiológicas del NO se produce a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs). La activación de la GCs por el NO, es un proceso complejo: primero el NO se une al hierro en el grupo hemo de la enzima, formando un complejo hexacoordinado, que se transforma posteriormente en un complejo pentacoordinado. Este cambio estructural aumenta la actividad enzimática unas 400 veces y como resultado da lugar a la conversión enzimática de la guanosina 5- trifosfato (GTP) en el segundo mensajero intracelular GMPc. No queda claro el mecanismo exacto a partir del cual el GMPc produce relajación del músculo liso vascular, aunque todo apunta a la implicación del calcio a través de varios procesos (*Figura 3*):

-1.- El GMPc podría estimular la salida del calcio por activación de la Ca⁺² ATPasa de la membrana plasmática (*Popescu y cols., 1985a; 1985b*). Se piensa que la cinasa dependiente de GMPc (cGK) regula esta bomba de calcio por medio de la fosforilación de una proteína intermediaria, posiblemente una fosfatidilinositol kinasa.

-2.- Un segundo mecanismo por el que el GMPc disminuye el calcio intracelular podría ser el aumentar su entrada en el retículo endoplásmico por medio de la regulación de una ATPasa de calcio similar a la encontrada en la membrana plasmática (*Twort y Van Breemen, 1988*).

-3.- El intercambio de sodio y calcio a través de la membrana plasmática podría también representar una forma de control de la homeostasis del calcio mediada por cGK (*Hobbs e Ignarro, 1997*).

-4.- El GMPc podría tener un efecto dual en la actividad de los canales de calcio: por un lado suprime directamente el movimiento de los iones a través de los canales de calcio tipo L y por otro impide la entrada de calcio, puesto que incrementa el retraso de la salida de la corriente de potasio (*Bkaily y cols., 1988*).

También se ha descrito un efecto inhibitor del GMPc sobre los canales de calcio operados por receptor (*Hobbs e Ignarro, 1997*).

Otra manera que tiene la GMPc de regular la homeostasis del calcio es mediante la modificación de la vía del 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (*Hobbs e Ignarro, 1997*).

Por otra parte, se han propuesto mecanismos independientes de GMPc para explicar parte de la acción vasodilatadora del NO, entre los que se incluyen la activación de diversos canales de potasio, que hiperpolarizan las células musculares lisas vasculares (*Cogolludo y cols., 2001; Ghanayem y cols., 2001*).

La concentración intracelular de GMPc es finalmente controlada por la acción de degradación de las fosfodiesterasas (PDEs). Las PDEs hidrolizan tanto el GMPc como el AMPc, dando lugar a formas biológicamente inactivas (5'-nucleótidos) (*Beavo y cols., 1995; Polson y Strada, 1996*). Se han descrito numerosas familias diferentes de PDE, de las cuales se derivan varias isoformas. La PDE-5 tiene preferencia por GMPc y parece ser la que tiene mayor relevancia en los procesos de hidrólisis de GMPc en el músculo liso vascular (*Moreno y cols., 2004*). El zaprinast y el sildenafil son potentes inhibidores específicos de la PDE5 (*Ziegler y cols., 1995a; 1995b; Hanson y cols., 1998*). El GMPc estimula la acción de la PDE-2 e inhibe la acción de la PDE-3. Por tanto y al ser la PDE-2 y la PDE-3 enzimas con especial predilección por la adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPc), representan un mecanismo por el cual el GMPc participa o interactúa en la relajación mediada por AMPc.

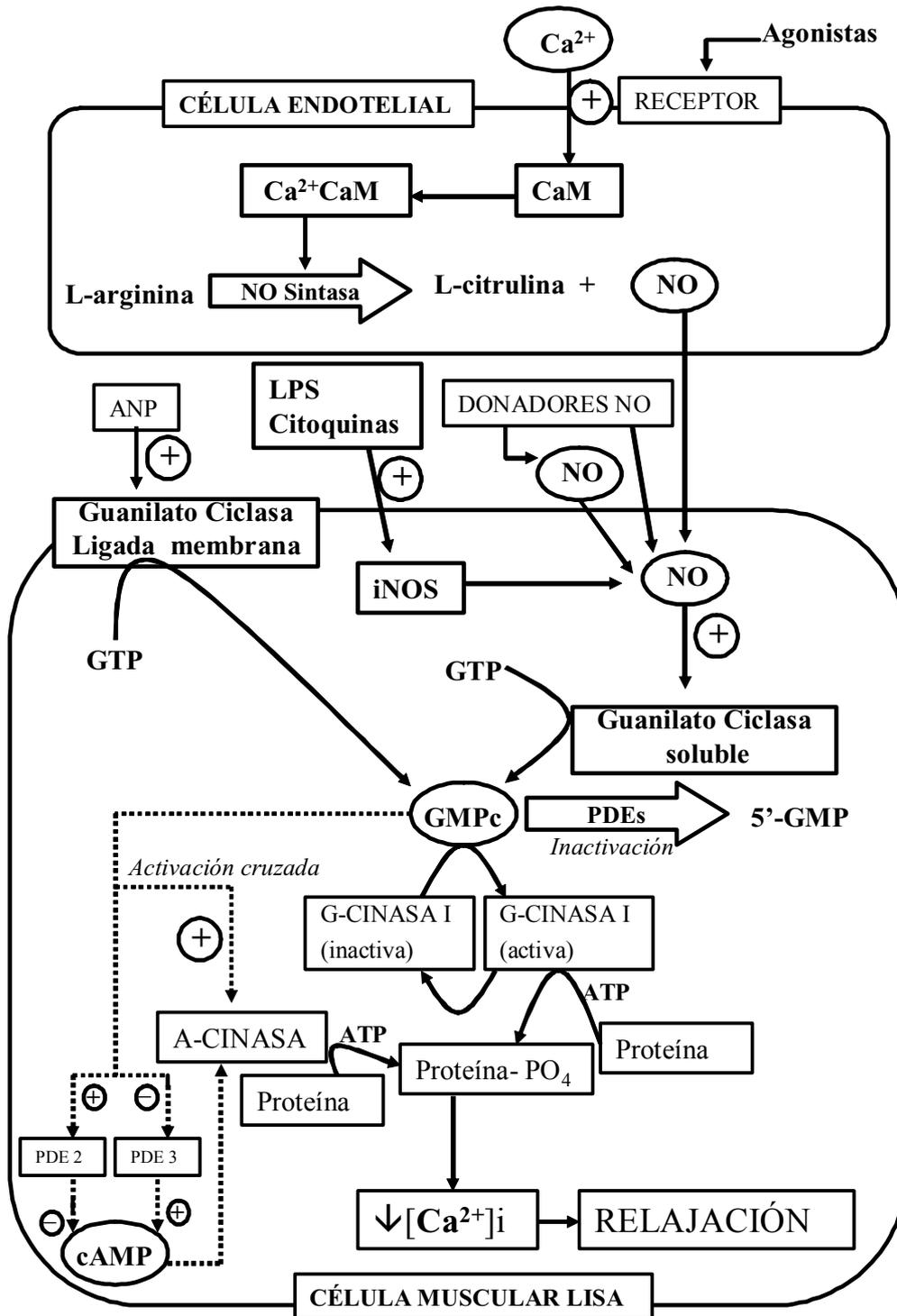


Figura 3. Mecanismo de acción del NO

3.1.3 NO en el pulmón perinatal

La vía del NO/GMPc participa de un modo muy relevante tanto en el control del tono vascular pulmonar fetal como durante el proceso de transición circulatoria postnatal (*Abman y cols., 1990; 1991; Cornfield y cols., 1992; Shaul y cols., 1992; Tikinsky y Morin, 1993; McQueston y cols., 1993*). A pesar de su elevada resistencia, la circulación pulmonar fetal libera continuamente NO en condiciones basales, como demuestran los efectos hipertensivos de la infusión de inhibidores de la NOS (*Abman y cols., 1990; Moore y cols., 1992*). Esto fue comprobado en experimentos que utilizaban antagonistas no específicos de la eNOS. Con el desarrollo de antagonistas específicos de la iNOS y la nNOS, se pudo posteriormente dilucidar el papel de estas dos isoformas en el control del tono vascular en el pulmón fetal (*Rairigh y cols., 1998; Rairigh y cols., 2000*). En fetos de cordero, la administración intrapulmonar de 3 inhibidores selectivos de iNOS causó de un 69 a un 82% de incremento en la resistencia vascular pulmonar (*Rairigh y cols., 1998*). De forma equivalente, la infusión de un inhibidor específico de nNOS aumentó la resistencia vascular pulmonar en el feto de cordero (*Rairigh y cols., 2000*). Además, las 3 isoformas de NOS se encuentran presentes en el pulmón de desarrollo y parece que desempeñan un papel en el control de la circulación pulmonar fetal. Así pues, el mecanismo de NO/GMPc interviene en:

- La modulación de la RVP en el feto
- El control de la respuesta vasodilatadora a estímulos específicos fisiológicos y farmacológicos.
- La reducción del potente tono miogénico en el pulmón fetal normal (*Abman y cols., 1999*).

En el momento del nacimiento, el NO va a jugar un papel determinante en la reducción de las RVP que se produce con las primeras respiraciones. En corderos a término, la reducción en la presión pulmonar producida por el nacimiento, fue abolida por la infusión de la NOS (*Abman y cols., 1990*). Se han llevado a cabo estudios para dilucidar cuál de los estímulos relacionado con el nacimiento es el que incrementa la producción de NO pulmonar. Así, se ha demostrado que la vasodilatación pulmonar, tanto inducida por ventilación con gas hipóxico como por la inhalación de oxígeno puro sin ventilación, son abolidas por los antagonistas de la NOS (*Cornfield y cols., 1992; Tikitinsky y cols., 1993*). De modo similar, la inhibición de la NOS, redujo el descenso en la RVP producido por los aumentos en flujo y “shear stress” inducidos por la compresión del ductus arteriosus (*Cornfield y cols., 1992*). Por tanto, tanto la expansión de los pulmones, el aumento de la oxigenación y el aumento del flujo pulmonar, son capaces de forma independiente, de estimular la producción de NO al nacimiento. Es más, la distensión rítmica de los pulmones y el aumento de la oxigenación, producen inducción de la expresión génica de la eNOS en vasos pulmonares (*Black y cols., 1997*).

Las razones para el aumento en la bioactividad pulmonar del NO en el momento del nacimiento no se conocen en su totalidad. El aumento de la actividad de la eNOS producido por un incremento de su expresión, un aumento de su función o una mayor disponibilidad de su sustrato (la L-arginina) o de sus cofactores pueden contribuir a su explicación (*Arrigoni y cols., 2002; Shaul y cols., 1993a*). Este hecho supondría un aumento en la cantidad total de NO sintetizado en el territorio vascular pulmonar. Por otra parte, una mayor sensibilidad de las células musculares lisas vasculares del territorio pulmonar al efecto vasodilatador del NO también explicaría que aún cuando no se modifique la síntesis endógena de NO, el efecto vasodilatador final sería mayor que en el momento del nacimiento (*Zellers y Vanhoute, 1991*). También, un aumento de bradicinina (BK) y de ATP secundarios al aumento de la P_aO_2 que se produce con el inicio de la ventilación y que a su vez, incrementan la síntesis y liberación del NO por las células endoteliales vasculares pulmonares podría justificar la vasodilatación pulmonar producida en los primeros instantes tras el nacimiento (*Konduri y cols., 1991*).

Una disminución del aclaramiento pulmonar del NO por la hemoglobina, pues cuando ésta se satura de O₂ presenta una mayor afinidad por el NO que su forma deoxigenada, sería otra explicación alternativa (*Iwamoto y cols., 1993*). Por último, un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) produciría una disminución de la formación del radical superóxido que tiene una acción inhibitoria sobre el NO (*MacKenzie y cols., 1998*).

Aparte de su papel central en el descenso agudo de las resistencias vasculares pulmonares en el momento del nacimiento, la vía del NO-GMPc desempeña también un papel de gran relevancia durante la segunda fase de descenso gradual de las RVP que tiene lugar durante las primeras semanas de vida postnatal. Cuando se compara la relajación inducida por el NO en arterias pulmonares en animales en el primer día de vida con esta respuesta en animales de 2-4 semanas, se observa un significativo aumento. Este fenómeno ha sido observado en numerosas especies, incluyendo el cerdo (*Villamor y cols., 1997; 2000; Pérez-Vizcaíno y cols., 2002*), cordero (*Abman y cols., 1991*) y conejo (*Morecroft y cols., 1998*). Este incremento con la edad en la respuesta a NO, parece estar producido no sólo por un hipotético incremento en la producción endotelial de NO, sino también por un incremento en la sensibilidad a éste de las células musculares lisas vasculares. Así, las arterias pulmonares de lechón de 2 semanas, no sólo presentan una mayor respuesta a la vasodilatación inducida por acetilcolina sino que también lo hacen a la vasodilatación mediada directamente por NO cuando las arterias están desprovistas de endotelio (*Moreno y cols., 2005; Villamor y cols., 2000; Pérez-Vizcaíno y cols., 2002*).

Los mecanismos responsables de este incremento en la respuesta a NO con la edad postnatal, han sido analizados mediante el uso de diversas herramientas farmacológicas que estimulan la vía NO/GMPc a distintos niveles. Ya hemos referido que la respuesta inducida por Ach aumenta con la edad y lo mismo ocurre con la respuesta al NO exógeno. Ambas respuestas son abolidas por inhibidores de la GCs, como el ODQ, lo que indica la ausencia de mecanismos independientes de GCs (*Moreno y cols., 2005; Villamor y cols., 1997; 2000; Pérez-Vizcaíno y cols., 2002*). Por otra parte, la respuesta a activadores de la GCs independientes de NO, como por ejemplo el YC-1, también aumentó con la edad postnatal (*Moreno y cols., 2004*). Sin embargo, la respuesta a análogos del GMPc, como el 8-Br-GMP, no cambió con la edad postnatal en arterias

pulmonares porcinas (*Moreno y cols., 2004; Villamor y cols., 2000*). Finalmente, se ha observado una tendencia con la edad al incremento en la respuesta vasodilatadora inducida por los inhibidores de PDE-5 (*Moreno y cols., 2005*).

La expresión y actividad de enzimas clave en la vía NO/GMPc, ha sido también estudiada tratando de buscar una explicación al incremento con la edad en la respuesta a esta vía. La expresión y actividad de la eNOS parece no cambiar con la edad (*Arrigoni y cols., 2002; Hislop y cols., 1995*), mientras que la actividad y expresión de la SOD citosólica (SOD-1), disminuye (*Pérez-Vizcaíno y cols., 2002; Villamor y cols., 2003a*). La expresión de la subunidad $\beta 1$ de la GCs aumentó también con la edad postnatal en arterias pulmonares porcinas tanto a nivel de expresión de la proteína como a nivel del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) (*Moreno y cols., 2005*). Finalmente, la expresión y actividad de la PDE-5 aumentó también con la edad postnatal en estos mismos vasos (*Moreno y cols., 2004*). Tomados juntos, todos estos resultados sugieren que el incremento con la edad en la capacidad vasodilatadora pulmonar de la vía NO/GMPc obedece a cambios en diversos puntos de la vía de señalización. En primer lugar, la biodisponibilidad de NO durante las primeras horas de vida, puede estar reducida debido a un aumento de su combinación con superóxido, como consecuencia de cambios diferenciales de SOD o de Ciclooxigenasa (COX) (*Moreno y cols., 2005; Morecroft y cols., 1998; Pérez-Vizcaíno y cols., 2002*). En segundo lugar, una menor expresión de GCs en el recién nacido también contribuiría a la menor dilatación mediada por NO en el recién nacido (*Moreno y cols., 2005*). La menor actividad de PDE-5 y consiguientemente la menor degradación de GMPc en el recién nacido podría, al menos parcialmente, contrarrestar los mecanismos previos (*Moreno y cols., 2004*). Finalmente, un incremento con la edad en la respuesta vasodilatadora mediada por el GMPc, es algo que no ha quedado totalmente excluido.

3.1.4 Influencia del NO en la etiopatogenia de la HPPN.

En las últimas décadas, la evidencia experimental desarrollada sobre la participación del endotelio -y más concretamente del NO- en el control del tono vascular tanto pulmonar como sistémico, ha sido abrumadora. Prácticamente desde el inicio de este conocimiento, se comienza a especular con la idea de que alteraciones en la vía del NO/GMPc pudieran estar involucradas en la fisiopatología de la hipertensión tanto pulmonar como sistémica. Centrándonos en la hipertensión pulmonar, se han descrito alteraciones en la producción y actividad del NO, tanto en modelos experimentales (*Dinh Xuan y cols., 1991; Adnot y cols., 1991*), como en pacientes adultos con hipertensión pulmonar (*Giaid y Saleh, 1995*).

La mayor parte de la información fisiopatológica que poseemos sobre la HPPN se basa en el modelo de compresión o ligadura fetal del ductus arteriosus en el cordero. Este modelo es el que en mayor grado ha conseguido reproducir la situación hemodinámica y anatomopatológica de la HPPN idiopática (*Abman, 1999*). Utilizando este modelo, se han descrito alteraciones prácticamente en cada uno de los pasos que componen la vía de vasodilatación mediada por el NO/GMPc. En un momento inicial se observó que en este modelo experimental de HPPN, existía una disminución de la vasodilatación producida por estímulos farmacológicos y fisiológicos que actuaban a través de la activación de la eNOS, tales como la Ach (*McQueston y cols., 1995*), el ionóforo de calcio A23187 (*Steinhorn y cols., 1995a*), oxígeno (*Abman y cols., 1989a; Zayek y cols., 1995*) y shear stress (*Abman y cols., 1989a*). Sin embargo, las respuestas vasodilatadoras inducidas por agonistas independientes de endotelio como el péptido natriurético atrial (*McQueston y cols., 1995*) o el NO inhalado (*Zayek y cols., 1995*), parecían estar respetadas. Estos hallazgos condujeron a la hipótesis de una alteración de la eNOS en este modelo experimental. Posteriormente, se demostró una disminución de la actividad enzimática de la eNOS (*Villamor y cols., 2003a*), así como una disminución en la expresión de la eNOS a nivel de proteína y de RNAm (*Villamor y cols., 2003a; Shaul y cols., 1997*). Una disminución de la interacción entre la eNOS y la Heat Shock Protein 90 (HSP 90) –que modula la actividad endotelial de NO- ha sido propuesto como uno de los mecanismos causantes de la menor actividad de la eNOS en el modelo de compresión crónica del ductus (*Konduri y cols., 2003*). Por otra parte, se ha descrito

también en este modelo, una disminución en las subunidades α_1 , α_2 , β_1 de la GCs así como un incremento en la actividad de la PDE-5. De hecho, el tratamiento crónico con el inhibidor de la PDE-5 sildenafil, previno la aparición de HPPN tras compresión crónica del ductus (*Larrue y cols., 2005*). Por tanto, en el modelo experimental de HPPN por compresión crónica del ductus, existe una producción reducida de NO en respuesta a estímulos físicos y farmacológicos. Este NO actúa sobre una GCs alterada y, como consecuencia de ello, se produce menos GMPc. Dicho GMPc se degrada más rápidamente a la forma inactivada 5'GMP, debido a un aumento de la actividad de la PDE-5 (*Abman y cols., 1999*).

Sin embargo, resulta difícil determinar si el daño de la vía NO/GMPc es causa o consecuencia de la HPPN. Si un déficit en la producción o en la actividad de NO fuera la causa de la HPPN, el bloqueo crónico farmacológico de la producción de NO endotelial debería reproducir los efectos hemodinámicos y anatomopatológicos de ésta. Sin embargo, la administración crónica de antagonistas de la NOS, no reproduce HPPN en el feto del cordero como sí lo hace la compresión del ductus (*Fineman y cols., 1994*). De modo interesante, sí se ha observado alteración de la función endotelial e incremento de la muscularización de las arterias pulmonares tras la administración crónica de antagonistas de la NOS en modelos desarrollados en no mamíferos como es el embrión de pollo (*Villamor y cols., 2005*).

Las evidencias directas de una alteración de la vía NO/GMPc en pacientes con HPPN, son difíciles de obtener. Sin embargo, Dollberg y cols. (*1995*), demostraron una disminución en los metabolitos urinarios del NO, es decir, nitratos y nitritos, en niños con HPPN y Christou y cols. (*1997*) demostraron una disminución de los niveles plasmáticos de GMPc. Casillo y cols. (*1995*) encontraron una disminución en la excreción urinaria de nitratos y una disminución en la utilización plasmática de L-arginina en la fase aguda de la HPPN cuando se comparó con el período de convalecencia. Villanueva y cols. (*1998*) observaron una disminución en la expresión genética de la eNOS en cultivos endoteliales de la vena umbilical de recién nacidos con HPPN. Sin embargo, este hallazgo se limitó a aquellos pacientes que presentaron HPPN relacionada con la asfisia perinatal. Por otra parte, limitaciones en el sustrato –L-

arginina- se han demostrado en recién nacidos con HPPN (*Vosatka y cols., 1994; Pearson y cols., 2001; Kavvadia y cols., 1999*) La L-arginina es un amino ácido semiesencial que se produce durante el ciclo de la urea (*Pearson y cols., 2001*). De manera muy interesante, algunos polimorfismos funcionales en enzimas del ciclo de la urea –particularmente la carbamoil-fosfato-sintetasa- se han relacionado con una menor producción de L-arginina en pacientes con patologías – incluyendo la HPPN- en las que se implica una menor actividad de la NOS (*Pearson y cols., 2001; Summar y cols., 2004*)

3.1.5 El NO y el estrés oxidativo

El NO tiene un electrón desapareado. Es por tanto un radical libre y como tal va a reaccionar fundamentalmente con otros radicales libres y con metales de transición, como el hierro del grupo hemo o el cobre. La bioquímica del NO como radical libre puede ser simplificada a cuatro reacciones fundamentales:

1.- La unión al hierro presente en hemoproteínas como la GCs o la hemoglobina. La unión a GCs es, como hemos visto, el mecanismo fundamental por el que el NO media sus efectos biológicos. La unión a la hemoglobina da lugar a la formación de metahemoglobina y es el mecanismo responsable de barrer el NO del torrente sanguíneo y limitar sus efectos a las células vecinas a la que lo ha liberado.

2.- En presencia de altas concentraciones de oxígeno, el NO reaccionará con éste para formar NO₂. Esta reacción no se produce en condiciones fisiológicas pero es de gran importancia cuando se usa el NO inhalado en combinación con el oxígeno del respirador.

3.- La reacción del NO con el anión superóxido, da lugar a la formación de la toxina binaria peroxinitrito (ONOO^-). En condiciones normales, no se produce esta reacción al estar la concentración de O_2^- controlada por la SOD, que lo transforma en O_2 y en H_2O_2 a una velocidad de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por tanto, tanto la SOD como sus miméticos, pueden tener un papel antioxidante y protector del efecto del NO como vasodilatador pulmonar (*MacKenzie y cols., 1998*).

4.- Tras un proceso adicional de oxidación, el NO puede reaccionar con grupos tioles de proteínas, dando lugar a la formación de nitrosotioles. De manera muy reciente, se ha propuesto que el NO “capturado” por la oxihemoglobina (ver reacción 1), pudiera ser transferido a un grupo tiol en la cisteína de la globina ($\text{Cys}\beta 93$), de la que sería liberado al transformarse la oxihemoglobina en desoxihemoglobina al disminuir la concentración de oxígeno (*McMahon y cols., 2002*). Este mecanismo ha sido propuesto como una forma de transporte del NO que sería liberado en condiciones de hipoxia contribuyendo a la vasodilatación en tejidos que recibieran una menor concentración de oxígeno (*Lane y Gross; 2002*).

Cuando utilizamos el NO en inhalación para el tratamiento de la HPPN, obtenemos ejemplos de estas cuatro reacciones. Así, la acción vasodilatadora que buscamos va a estar mediada por la activación de la GCs tras la unión del NO al grupo hemo del enzima. El NO sólo va a ser efectivo en los vasos pulmonares, puesto que va a ser inactivado al unirse al grupo hemo de la oxihemoglobina. La presencia de metahemoglobina debe ser controlada, por tanto, en estos pacientes (*Kinsella y cols., 1992; Philips y cols., 1999; Young y Dyar, 1996; Davidson y cols., 1998; Macrae y cols., 2004*). También debemos controlar la formación de NO_2 como consecuencia de la reacción del NO con el O_2 molecular (*Davidson y cols., 1998; Bouchet y cols., 1993*). La combinación con superóxido puede dar lugar a la formación de peroxinitritos, aunque un aumento en la formación de éstos no ha sido confirmado de manera concluyente en modelos experimentales o en pacientes sometidos a la inhalación de NO (*Hallman y cols., 1998*). Sin embargo, la suplementación con SOD, que va a producir una disminución en la producción de superóxido, aumenta la respuesta al NO inhalado (*Steinhorn y cols., 2001*). Por último, un posible efecto a distancia del NO debido a su

liberación desde la globina (ver reacción 4) no ha sido hasta el momento comprobado tras la inhalación de NO.

El tratamiento de la HPPN con NO inhalado se detalla en el apartado 2.6.2.

3.2 Endotelina-1

3.2.1 Características principales

3.2.2 ET-1 en el pulmón perinatal

3.2.3 ET-1 en la HPPN

3.2 Endotelina-1:

3.2.1 Características principales:

La endotelina-1 (ET-1), es un polipéptido de 21 aminoácidos que fue identificado en 1988 por Yanagisawa y cols. (1988). La ET-1 está presente en numerosas especies de mamíferos incluyendo los humanos. Dos isopéptidos más (ET-2 y ET-3) codificados por genes separados pero con una gran homología en la secuencia de aminoácidos, fueron posteriormente identificados. El producto inicial del gen de la ET-1 humana – que se localiza en el cromosoma 7- es el péptido preproET-1 de 212 aminoácidos, que se convierte posteriormente en proET-1 de 183 aminoácidos y finalmente en la big ET-1, péptido de 38 residuos. A través de la acción de las enzimas conversoras de la ET (ECE), la big ET-1 se transforma en la ET-1. Esta última conversión resulta imprescindible para llevar a cabo la actividad biológica; la acción presora de la big ET-1 se anula casi por completo cuando se inhibe la ECE (Matsumura y cols., 1990; Gardiner y cols., 1991). Las ECE que se encuentran en las células endoteliales son diferentes a las que se encuentran en las células musculares lisas. En el endotelio, las ECE son específicas para la big ET-1 (Plumpton y cols., 1996; Davenport y cols., 1998) mientras que las del músculo liso son capaces de procesar la big ET-2 y la big ET-3 (Tsukahara y cols., 1993; Maguire y cols., 1997; Davenport y cols., 1998).

Aunque el endotelio vascular es la mayor fuente de ET-1, los genes que codifican los tres isopéptidos, se expresan en una gran variedad de células, que incluyen: miocitos cardiacos, células musculares lisas vasculares e intestinales, epitelio tubular renal,

células mesangiales, células gliales, pituitaria, macrófagos, etc (*Inoue y cols., 1989; Sakurai y cols., 1991*).

En los vasos sanguíneos, los efectos de las ET están mediados a través de al menos tres tipos distintos de receptores (ETA , ETB-1, ETB-2). Los receptores ETA y ETB-2 se localizan en el músculo liso vascular y su activación produce vasoconstricción. El receptor ETB-1, se localiza en el endotelio vascular y su activación produce vasodilatación endotelio dependiente (*Zimmermann y Seifert, 1998*). La síntesis y liberación de ET-1 se estimula por la angiotensina II (AII), la noradrenalina, la trombina, el factor de crecimiento tumoral beta (TGFβ), el factor de crecimiento dependiente de plaquetas (PDGF), los ésteres de forbol, la interleucina-1, la arginina-vasopresina (AVP), la hipoxia, la endotoxemia, la glucosa y “shear stress” (*Liben y cols., 1993*).

A pesar de las numerosas investigaciones, la significación fisiológica de la función de la endotelina en el control del tono vascular, no ha sido completamente aclarada. Los niveles plasmáticos de ET son muy bajos, lo que lleva a pensar más en una acción autocrina-paracrina que en una acción a distancia. Dependiendo del tono vascular previo, las ET pueden producir vasoconstricción o vasodilatación pulmonar (*Wong y cols., 1994*). En condiciones basales los tres isopéptidos producen vasoconstricción pulmonar, siendo la ET-1 la más potente. Así mismo, la ET-1 también aumenta el tono simpático central y periférico y estimula la liberación de AVP, de renina, de AII y de aldosterona y potencia los efectos de otros vasoconstrictores como la noradrenalina, la serotonina (5HT), la AVP y la AII. Sin embargo, cuando el tono vascular pulmonar está elevado, como por ejemplo en la vida fetal o tras el uso de agentes vasoconstrictores, las ET producen vasodilatación pulmonar (*Wong y cols., 1993*). La respuesta vasoconstrictora está mediada por los receptores ETA localizados en la células musculares lisas vasculares (*Kuo, 2001; Perreault y cols., 2001a; 2001b*), mientras que la repuesta vasodilatadora se produce a través de la estimulación de los receptores ETB que inducen la liberación de NO y de PGI₂ por las células endoteliales.

La vía de señalización de la respuesta vasoconstrictora de las ET implica la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la hidrólisis del inositol fosfato (IP) en inositol-1,4,5-

trifosfato (IP₃) y DAG. El IP₃ aumenta la [Ca²⁺]_i, al facilitar su liberación desde los depósitos intracelulares y aumentar su entrada a través de los canales tipo L de la membrana celular. El DAG activa la cinasa de la proteína C (PKC), aumentando la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺ (Berkenbosch y cols., 2001). Además, la ET-1 bloquea los canales de K activados por ATP (K_{ATP}), lo que despolariza la membrana y facilita la apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje, produciendo vasoconstricción. Igualmente, la ET-1 activa la fosfolipasa A₂ (PLA₂), aumentando la síntesis de ácido araquidónico y posteriormente de la PGE₂ que produce un efecto vasoconstrictor pulmonar.

Además, la ET-1 exhibe propiedades mitogénicas, estimulando la síntesis de ADN y de proteínas, y la proliferación de fibroblastos y de células musculares lisas vasculares pulmonares. Estas acciones están mediadas a través de la estimulación de los receptores ETA (Giaid y cols., 1993).

3.2.2 ET-1 en el pulmón perinatal

El papel fisiológico de la ET-1 en el control del tono vascular pulmonar fetal es objeto de controversia. La ET-1 está presente y activa en el pulmón fetal (Ivy y cols., 1994; 1996a; 1996b; Jones y Abman, 1994; Tod y Cassin, 1992). La administración aguda de ET-1 produce vasodilatación pulmonar en el feto (Lipton y cols., 1991; Cassin y cols., 1991) mientras que administraciones más prolongadas producen efectos vasoconstrictores (Chatfield y cols., 1991; Liben y cols., 1993). Algunos estudios han destacado que al final de la gestación, se tiende a la respuesta vasodilatadora, ya que la mayoría de los receptores activos serían ETB-1 (Cassin y cols., 1991; Wong y cols., 1993). Por el contrario, otros estudios han demostrado un importante papel de los receptores vasoconstrictores ETA al final de la gestación (Wang y cocean, 1992; Ivy y cols., 1994; 1996a; 1996b). Una de las limitaciones de estos resultados, es que la administración exógena de endotelina puede no reflejar los efectos endógenos de un compuesto que como hemos mencionado previamente, ejerce sus funciones probablemente de un modo autocrino o paracrino.

En este sentido, quizá resulten más interesantes aquellos experimentos en los que se llevó a cabo un bloqueo de los receptores. El bloqueo selectivo del receptor ETA, produjo vasodilatación pulmonar (*Ivy y cols., 1994*), mientras que el bloqueo selectivo del ETB no produjo cambios en el tono vascular pulmonar fetal (*Ivy y cols., 1996a*). Por otra parte, la estimulación tanto aguda como crónica de los receptores ETB con sarafotoxina S6c, produjo vasodilatación, lo que sugeriría una presencia mayor de receptores ETB-1. Sin embargo, estudios en lechones neonatales, muestran la presencia de receptores ETB-1 y ETB-2 en los vasos pulmonares (*Ivy y cols., 1994*). Finalmente, parte de los cambios con el desarrollo en la actividad de la endotelina-1, pueden deberse a diferencias en el ECE. En este sentido, *Ivy y cols. (2004)*, describen que en el feto de cordero, el ECE se expresa exclusivamente en el endotelio, mientras que en la vida postnatal lo hace tanto en el endotelio como en las células musculares lisas vasculares.

El posible papel de la ET-1 en la transición circulatoria pulmonar en el momento del nacimiento, es algo que no está completamente aclarado. Sin embargo, el bloqueo combinado de ETA y ETB con Ro 47-0203, no produjo cambios en el descenso de la RVP tras la ventilación de pulmones fetales (*Winters y cols., 1996*). Por el contrario, *Ivy y cols. (2004)*, describen que el bloqueo de receptores ETB con BQ - 788, produce una significativa atenuación de la vasodilatación pulmonar en el momento del nacimiento.

3.2.3 ET-1 en la HPPN

Los niveles circulantes de ET-1 se encuentran marcadamente elevados en pacientes con HPPN y se relacionan con la severidad de la enfermedad, de tal forma que disminuyen cuando la HPPN está en fase de resolución (*Rosenberg y cols., 1993*). El tratamiento con NO inhalado contribuye a un descenso más rápido de los niveles de ET-1 (*Truog y cols., 2002*). Los niveles de ET-1 se encuentran también elevados en la sepsis neonatal, entidad que asocia frecuentemente HPPN (*Figueras y cols., 2003*). En general, los niveles de ET-1 se elevan en diversas formas de hipertensión pulmonar, como en la hipertensión pulmonar idiopática (*Cacoub y cols., 1993*); síndrome de Eisenmenger (*Cacoub y cols., 1993*) y en la hipertensión pulmonar en relación con cardiopatía congénita (*Vincent y cols., 1993*) y displasia broncopulmonar (*Allen y cols.,*

1993). En pacientes adultos con hipertensión pulmonar, se ha descrito un incremento de la expresión del gen de la ET-1 en el endotelio vascular (*Giaid y cols., 1993*). También, se han encontrado niveles elevados de ET-1 y aumentos de la expresión génica tanto de la ET-1 como de sus receptores en modelos experimentales de hipertensión pulmonar en animales adultos como la inducida por monocrotalina (*Miyauchi y cols., 1993; Yorikane y cols., 1993*) o la hipoxia crónica (*Li y cols., 1994*). Los antagonistas de receptores de endotelina como Bosentan (antagonista de receptores ETA y ETB), Sitaxsentan (antagonista receptor ETA) y Ambrisentan (antagonista receptor ETB), han supuesto un importante avance terapéutico en la hipertensión arterial pulmonar (*Humbert y cols., 2004*).

En el modelo de HPPN por compresión crónica del ductus, Ivy y cols. (1996b) demuestra un incremento de los niveles de endotelina junto con una pérdida progresiva de la acción vasodilatadora mediada por receptores ETB y persistencia de la acción vasoconstrictora mediada por receptores ETA. Es más, este mismo grupo observó en este modelo, un aumento del RNAm de la preproET-1, lo que sugiere que la combinación de una ET-1 aumentada junto con un descenso de su acción a nivel de los receptores ETB, pueda contribuir al incremento del tono vasoconstrictor en la HPPN (*Ivy y cols., 1998*). Por otra parte, el bloqueo crónico del receptor ETA con BQ - 123, produjo una reducción de la muscularización arterial y de la hipertrofia derecha en el modelo de HPPN por compresión crónica del ductus, así como una disminución en las alteraciones hemodinámicas tras el nacimiento (*Ivy y cols., 1997*).

3.3 Eicosanoides/Prostanoides

3.3.1 Definición, mecanismos de producción.

3.3.2 Receptores de prostanoides.

3.3.3 Eicosanoides en el pulmón perinatal.

3.3.4 Eicosanoides e HPPN.

3.3.1 Definición, mecanismos de producción

Los eicosanoides son un grupo de compuestos generados a partir del ácido araquidónico y que son sintetizados en numerosos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales (*Coceani y Olley, 1988*). El ácido araquidónico puede ser metabolizado por dos vías principales. La ciclooxigenasa (COX), también llamada sintetasa H endoperóxido (PGHs), da lugar a la formación de prostanoides, que son: prostaglandinas (PGs: PGE₁, PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGH₂ y PGI₂) y tromboxanos (TXA₂ y TXB₂). La vía de la lipooxigenasa, da lugar a los leucotrienos (LTs). Una tercera vía sería la de la monooxigenasa, que da lugar a los ácidos epoxieicosatrienoicos (*Holtzman y cols., 1991*), cuya relevancia fisiológica aún no está aclarada (*Murphi y cols., 1989; Smith y DeWitt, 1996*). Por último, un cuarto mecanismo en el que no se implican enzimas, da lugar a los ISOPROSTANOS, tras el catabolismo del ácido araquidónico por medio de los radicales libres. De ellos nos ocuparemos en profundidad en el capítulo cuatro.

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) citosólica, activada por el calcio y la calmodulina, sintetiza el ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana (*Cirino y cols., 1998*). La COX media los pasos de ácido araquidónico a PGG₂ y de ésta a PGH₂ (**Figura 4**). A partir de la PGH₂, se sintetizan mediante isomerasas específicas, las PG E₂, D₂, F_{2α} y por medio de la acción de la TX sintetasa se forma el TXA₂, principal vasoconstrictor de la circulación pulmonar.

Inicialmente se forma un endoperóxido intermedio, PGH_2 , que rápidamente se metaboliza para formar el resto. Las PGs G y H tienen prácticamente el mismo anillo, sólo se diferencian en que en el carbono 15, se emplaza un grupo hidroperóxido y uno hidrófilo respectivamente. El TXA_2 posee un anillo hexano en lugar de uno ciclopentano. Las PGG, PGH, PGI y el TXA son moléculas inestables químicamente por lo que rápidamente se degradan hacia metabolitos inactivos. Tienen una vida media de 30 segundos a escasos minutos. Las otras PGs se inactivan enzimáticamente durante su primer paso a través del pulmón. Se cree que la mayoría de los prostanoideos ejercen su función de forma local en el sitio donde se han formado. Las PG contienen un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales llamadas α y ω unidas al anillo. Se clasifican en varios tipos (de la A a la I) según las características del anillo. Los tipos A, B y C no se producen de forma natural.

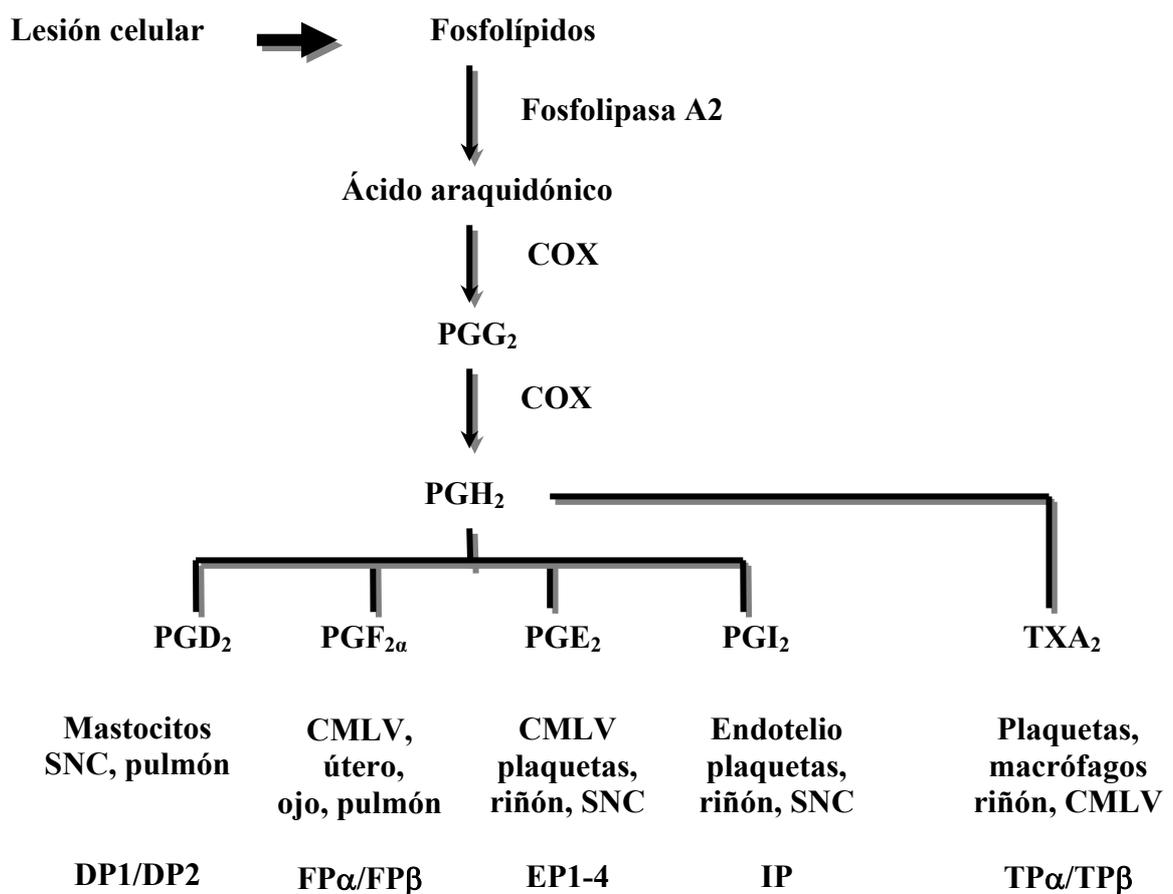


Figura 4. Síntesis de tromboxano y prostaglandinas, localización celular de la producción e identificación de los receptores de cada respectivo compuesto vasoactivo.

Se conocen dos isoformas de COX, la COX-1 y la COX-2. Las dos pueden ser inhibidas por antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina. Tanto la COX-1 como la COX-2 se localizan en el lumen del retículo endoplásmico y en la membrana nuclear externa (Morita y cols., 1995), lo que implica que la síntesis de PG sea intracelular.

La COX-1 se constituye de forma activa mientras que la COX-2 se induce por distintos estímulos (Smith y DeWitt, 1996). La isoenzima COX-1, constitutiva, es una proteína de 599 aminoácidos con un peso molecular de 70 kDa sintetizada a partir de la secuencia de un DNA de 27 kilobases en la mayoría de las células del organismo (Seibert y cols., 1997).

La COX-2, que presenta una homología del 59% con la COX-1, es un polipéptido de 604 aminoácidos sintetizado a partir de la información codificada en un DNA de 22 kilobases (Xie y cols., 1991). Aunque la región que se une al sustrato es idéntica estructuralmente en ambas isoformas, la conformación de los aminoácidos que constituyen la región catalítica es diferente, lo que explica sus diferentes efectos. Su actividad se induce en presencia de mediadores inflamatorios (citoquinas, endotelinas, serotonina, ácido araquidónico, TXA₂), de factores de crecimiento (derivado de las plaquetas (PDGF), endotelial (EGF)), de hormonas (tiroxina y gonadotropina coriónica), de lipopolisacáridos bacterianos, de ésteres de forbol (Mitchell y cols., 1999) y de factores mecánicos (fuerzas de fricción y flujo pulsátil). Se ha demostrado que *in vivo* existe un aumento de la expresión del enzima en procesos inflamatorios, en enfermos con artritis reumatoide y en procesos isquémicos (Beiche y cols., 1996). Como factores reguladores de la expresión de la COX-2, se han descrito las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Feng y cols., 1995), la interleucina 6, la fosforilación del gen c-Jun, la ceramida, las proteína cinasas activadas por mitógenos, el 17β-estradiol y los glucocorticoides (Morisset y cols., 1998).

Hay procesos en los que se implican de forma específica la COX-1 o la COX-2 (agregación plaquetaria para COX-1; y ovulación para COX-2); por otro lado se han descrito acciones que dependen de la colaboración de ambas enzimas (carcinogénesis, inflamación). Por último, se ha visto que la eliminación de una de las isoformas mediante manipulación genética, trae consigo una sobreexpresión de la otra isoforma (Smith y Langenbach, 2001).

3.3.2 Receptores de prostanoïdes

Existen receptores específicos para TX, PGI, PGE, PGF y PGD, que se denominan respectivamente: TP, IP, EP, FP y DP (Coleman y cols., 1990). El receptor EP se subclasifica en tres tipos: EP₁, EP₂ y EP₃, a través de los cuales puede ejercer su acción la PGE₂ y que se diferencian en la distinta respuesta que varios análogos pueden desencadenar al actuar sobre ellos. Posteriormente se ha detectado el EP₄, el cual, al igual que el EP₂ se acopla a la adenilato ciclasa pero se diferencia de éste en la respuesta que provocan varios ligandos (Coleman y cols., 1994). En general, los ocho receptores de prostanoïdes se codifican cada uno por genes diferentes. Se agrupan en tres categorías según la transducción de la seña que generan:

-Receptores relajantes: aumentan el AMPc e inducen la relajación del músculo liso. Son el IP, DP, EP₂ y el EP₄.

-Receptores contráctiles: TP, FP y EP₁: inducen contracción mediante la movilización del calcio y/o la sensibilización de las proteínas contráctiles al calcio.

-Receptor inhibitorio: EP₃: inhibe la relajación del músculo liso mediante la disminución del AMPc.

Cada uno de los ocho tipos y subtipos de receptores de prostanoïdes muestra una especificidad de unión a sus ligandos selectiva para cada uno de ellos. El problema para determinar la especificidad es que en la mayoría de los tejidos se combinan más de un receptor por el que pueden actuar a su vez varios prostanoïdes con diferente afinidad. Kiriyaama y cols. (1997) recapitularon los valores de la constante de inhibición (K_i) de un conjunto de 33 prostanoïdes y sus análogos para cada uno de los ocho receptores (**Tabla 3**). Este trabajo se realizó en cultivos celulares de ovario de hamster, por lo que no son totalmente extrapolables a otras especies, sin embargo, ya se han obtenido valores similares para algunos receptores en humanos (Narumiya y cols., 1999).

Tabla 3. Valores de la constante de inhibición (K_i) de varios prostanoïdes y sus análogos para los ocho tipos de receptores de prostanoïdes que se encuentran en células de ovario de hamster Chino. La constante de inhibición (K_i) se expresa en nM. [Modificado de Kiriyama y cols.]

Ligando	DP	IP	TP	FP	EP ₁	EP ₂	EP ₃	EP ₄
PGD2	21			47			280	
BW245C	250			1700				
BWA868C	220							
Cicaprost		10			1300		170	
Iloprost		11			21	1600	27	2300
Carbacyclin		110		1200		1600	31	2300
Isocarbacyclin		15				1000	31	
Beraprost		16					110	
ONO-1301		47					740	
S-145			0.7					
I-BOP			0.6	100		220	100	
GR-32191			13					
STA2	1600		14	100		220	23	350
SQ-29548			13					
U-46619			67	1000				
PGF _{2α}				3	1300		75	
Fluoroprostenol				4				
PGE ₂				100	20	12	1	2
PGE ₁		33			36	10	1	2
17-Phenyl-PGE ₂				60	14		4	1000
Sulprostone				580	21		0.6	
M&B-28767			1300	124	120		0.7	500
16,16-Dimethyl-PGE ₂				350		17	2	43
11-Deoxy-PGE ₁					600	45	2	23
GR-63799X							2	480
19R(OH)-PGE ₂				1000				
Misoprostol					120	250	67	67
Butaprost						110		
1-OH-PGE ₁							330	190
AH-13205						240	82	
AH-6809						350		

La estructura del receptor TP se muestra en la **Figura 5** como un modelo de receptor de prostanoïdes. Es una proteína compuesta por 343 aminoácido, con 7 dominios transmembrana y acoplado a la proteína G. En humanos se han detectado dos receptores TP, el TP α y el TP β (Kinsella y cols., 2001; Hirata y cols., 1991; Nusing y cols., 1993; Raychowdhury y cols., 1994; 1995). Uno de ellos se clonó inicialmente a partir de las plaquetas/placenta (la isoforma TP α) y el otro (TP β) de las células endoteliales de la vena umbilical de humano. La expresión de las dos isoformas así como su distribución es diferente, lo que da a entender que poseen distintos mecanismos de regulación (Miggin y cols., 1998). Parece ser que el TP α puede ser la isoforma implicada en la homeostasis vascular.

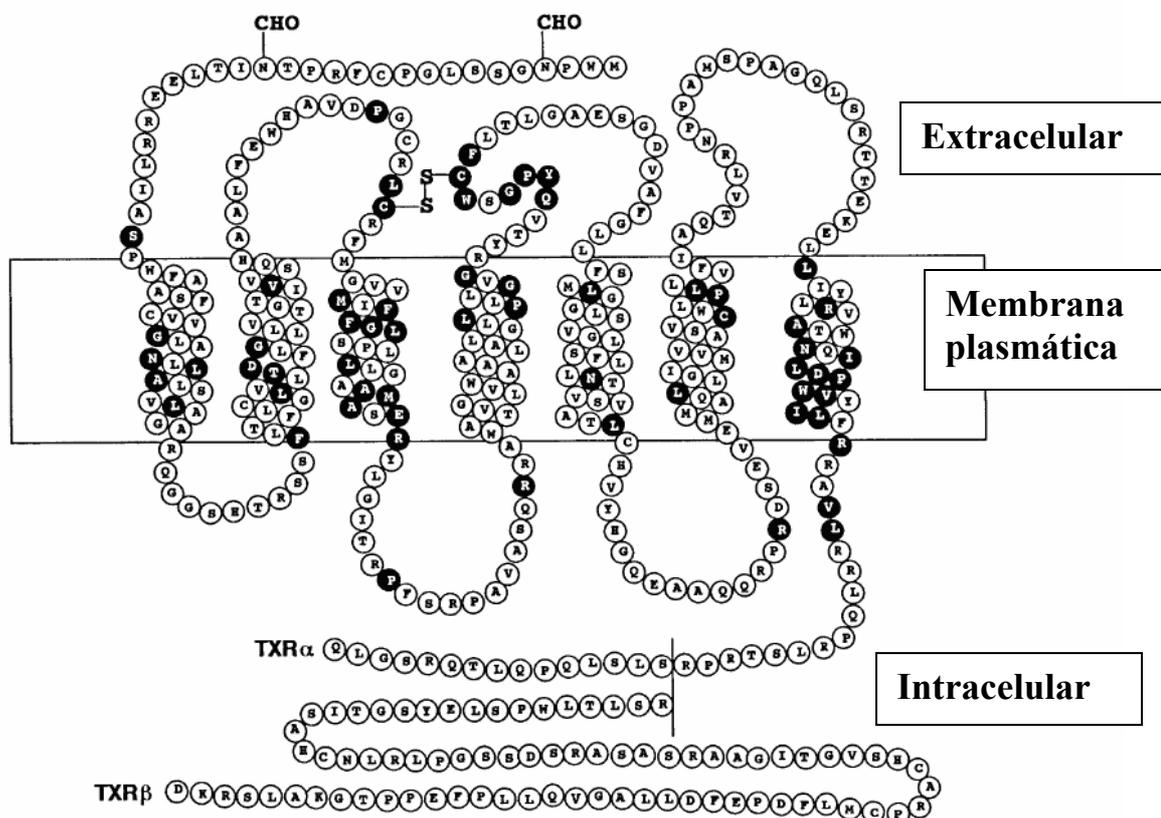


Figura 5. Estructura del receptor de TXA₂ humano. Los residuos de aminoácidos se indican por los códigos de letras. Las dos isoformas difieren sólo en el extremo carboxi-terminal. Los residuos de aminoácidos que se muestran mediante círculos negros con letras blancas, aún se conservan en la mayoría de los receptores de prostanoïdes.

3.3.3 Eicosanoides en el pulmón perinatal

La PGI₂ es la PG de la que poseemos más información referida a su papel en que el control del tono vascular pulmonar fetal y durante los procesos de transición de la circulación fetal. Los vasos pulmonares fetales generan PGI₂ (*Terragno y Terragno, 1979*) y la administración exógena de PGI₂ produce vasodilatación del pulmón fetal. La producción de PGI₂ aumenta durante la gestación y se correlaciona de forma directa con el aumento de la expresión del gen de la COX-1 (*Shaul y cols., 1999*) y a su vez con los niveles plasmáticos de estrógenos, así como con la activación de los receptores de estrógenos (*Brannon y cols., 1998*). La producción de PGI₂ intrapulmonar durante el período fetal se modifica por los cambios en la concentración de oxígeno. Cuando baja la concentración, disminuye la síntesis y viceversa (*Shaul y cols., 1992*). En la última etapa fetal, aumenta la producción de PGI₂ con la ventilación y la oxigenación (*Leffler y cols., 1980; 1984a; 1984b*). Por otro lado, con los trabajos de *Velvis y cols. (1991)* se vio que al inhibir la COX, se anulaba la caída de las RVP asociada a la distensión rítmica de los pulmones (con gas hipóxico), pero que no tuvo efecto en la RVP durante la distensión estática o durante la ventilación con oxígeno. Esto demuestra que bajo circunstancias normales (es decir, ventilación con oxigenación), la producción de PGI₂ no resulta esencial para la transición postnatal (*Velvis y cols., 1991; Ziegler y cols., 1995a*).

Las PG de las series D y E actúan como vasodilatadores en el pulmón fetal (*Coceani y Olley, 1988*). Los niveles plasmáticos de PGE₁ y PGE₂ aumentan en la circulación pulmonar durante el nacimiento, comportándose como vasodilatadores moderados y la PGE₂ se le ha implicado en el cierre del ductus arterioso (*Bouayad y cols., 2001*). Por otro lado, la PGD₂ se comporta como vasodilatador pulmonar en fetos de cerdo y en corderos recién nacidos, pero a los 10 días de vida postnatal, su efecto es vasoconstrictor (*Soifer y cols., 1983*). Curiosamente, este doble efecto se ha observado también con la histamina. Ambos mediadores se acumulan en los mastocitos, cuyo número aumenta al final de la gestación y disminuye marcadamente tras el nacimiento, por lo que es posible que la ventilación pulmonar induzca la degranulación de dichas células, liberando histamina y PGI₂, contribuyendo a la vasodilatación pulmonar en los primeros momentos de vida postnatal. Además, la histamina estimula la secreción de

factor activador plaquetario (PAF), potente vasodilatador pulmonar, especialmente en circunstancias en las que el tono vascular pulmonar está aumentado.

Las PG de la serie F producen vasoconstricción pulmonar (*Cocani y Olley, 1988*) aunque este efecto no parece resultar de gran importancia como demuestra el hecho de que tras el nacimiento, la inhibición de la COX va a producir un efecto neto vasoconstrictor (*Ziegler y cols., 1995a*). Además, los efectos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena y endógena son complicados de valorar en lo que a la circulación perinatal se refiere. Hay que tener en cuenta que se implican muchos factores como los flujos uterinos, umbilicales y ductal, además del metabolismo feto-placentario de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (*Leffler y cols., 1979*).

La inhibición de los leucotrienos disminuye las RVP en fetos de cordero (*Soifer y cols., 1985; Heymann y cols., 1988; Lebiadois y cols., 1987*). Se ha sugerido que la reducción de la producción de leucotrienos al nacer, contribuye al descenso de las RVP durante la transición postnatal (*Ziegler y cols., 1995a*). Sin embargo, la ausencia de especificidad de los antagonistas de los leucotrienos que se usaron en este estudio pone en tela de juicio la aportación real de los leucotrienos en la circulación fetal (*Ziegler y cols., 1995a*).

3.3.4 Eicosanoides e HPPN

Existen evidencias de estudios experimentales y en pacientes sobre la implicación de las alteraciones de la homeostasis de los eicosanoides en la patogenia de la HPPN (*Stenmark y cols., 1983; Shaul y cols., 1999*). La síntesis de PGI_2 está muy disminuida en arterias intrapulmonares aisladas del ternero recién nacido con hipertensión pulmonar (*Badesch y cols., 1989*). Sin embargo, se han detectado niveles altos de un metabolito de la PGI_2 en modelos experimentales de hipertensión pulmonar secundaria a aspiración de meconio (*Soukka y cols., 1998*). En estos modelos también se encontraron incrementos de los niveles de TXB_2 (metabolito estable del TXA_2) (*Soukka y cols., 1998*) y se han correlacionado los niveles de TXB_2 con el aumento de la presión arterial pulmonar en niños con síndrome de aspiración de meconio (*Bui y cols., 1992*). Las concentraciones de TXB_2 , de 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, PGD_2 , PGE_2 , LTB_4 y LTE_4 se encontraron

elevadas en niños con HPPN que requirieron tratamiento con ECMO. Tras el tratamiento, se comprobó que en los niños con buena evolución, descendían los niveles de eicosanoides, pero en los que presentaron una mala evolución clínica, los niveles se mantuvieron elevados. Por otra parte, existe una abundante evidencia experimental y clínica sobre el papel del TXA₂ en la HPPN relacionada con la sepsis neonatal, particularmente producida por el Estreptococo del grupo B (*Meadow y Rudinsky, 1995; Hammerman y cols., 1988; Runkle y cols., 1984; Truog y cols., 1986; Villamor y cols., 1996a*).

Se ha relacionado la HPPN con el uso materno de inhibidores de COX tales como indometacina o aspirina durante la gestación (*Levin y cols., 1978a; 1978b; Van Marten y cols., 1996*). Este efecto parece estar más relacionado con el cierre precoz del ductus arterioso -y por tanto con la presencia de hipertensión pulmonar intrauterina- que con un efecto directo de la inhibición de la COX en los vasos pulmonares (*Steinhorn y cols., 1995b; Abman y Stevens, 1996*). Sin embargo, no puede dejar de tenerse en cuenta la implicación de algunos eicosanoides –particularmente la PGI₂- en la modulación del desarrollo vascular pulmonar (*Huttner y cols., 1977*). De hecho, la inhibición crónica de la COX induce hipertensión pulmonar en la oveja adulta (*Meyrick y cols., 1985*).

3.4 Oxígeno

3.4.1 Características generales. Vasoconstricción pulmonar hipóxica.

3.4.2 Oxígeno y pulmón perinatal

3.4.3 Oxígeno e HPPN

3.4.4 Estrés oxidativo.

3.4.1 Características generales. Vasoconstricción pulmonar hipóxica

El tono vascular tanto pulmonar como sistémico, se encuentra bajo la influencia activa de los gases respiratorios. La tensión de oxígeno es, por tanto, un elemento fundamental en la homeostasis vascular y va a desempeñar un papel crítico en el proceso de transición entre la vida fetal y la postnatal. De hecho, uno de los núcleos de esta transición es el paso de un ambiente -el intrauterino- relativamente hipóxico a un ambiente -el atmosférico- con una mayor concentración de oxígeno. Por otra parte, las alteraciones en la homeostasis del oxígeno desempeñan un papel crucial en la patofisiología de numerosas enfermedades.

La circulación pulmonar reacciona ante la hipoxia con vasoconstricción, mientras que la sistémica lo hace con vasodilatación (*Archer y cols., 2002*). La respuesta de los vasos pulmonares a la hipoxia –la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH)- tiene por objeto dirigir el flujo sanguíneo a las áreas pulmonares mejor ventiladas (*Barnes y Liu, 1995*). Por otra parte, los procesos de remodelado vascular y la regulación molecular de la transcripción génica secundarias a la hipoxia también resultan diferentes en las circulaciones pulmonar y sistémica (*Hartsfield y cols., 1999; Yu y cols., 1998*). A pesar de haber sido objeto de intenso estudio, los mecanismos responsables de la VPH no han sido dilucidados en su totalidad (*Barnes y Liu, 1995*). Como mecanismos posibles se han propuesto tanto el aumento en la liberación de un agente vasoconstrictor como la disminución en la producción o en la actividad de un agente vasodilatador, o la acción directa de la tensión de oxígeno sobre las células musculares lisas vasculares pulmonares. En la búsqueda de un mediador químico de la VPH, se han propuesto

diversos agentes vasoactivos, tales como las catecolaminas (*Fishman, 1976*), histamina (*Hauge y cols., 1968*), Angiotensina-II (*Berkov y cols., 1974*), prostaglandinas (*Weir y cols., 1976; Shaul y cols., 1991*), leucotrienos (*Morganroth y cols., 1984; McDonnell y cols., 1990*), 5-HT (*Fishman y cols., 1976*), factor agregante plaquetario (*McCormack y cols., 1989a*) o ATP (*McCormack y cols., 1989b*). Sin embargo, ninguno de estos mediadores parece esencial para la VPH y su papel parece más bien el de modulador del proceso (*Barnes y Liu, 1995*). Lo mismo puede decirse sobre el papel del endotelio –y más particularmente del NO- en la VPH. El endotelio modula la VPH (*Graser y Vanhoutte, 1991; Holden y McCall, 1984; Johns y cols., 1989; Kovitz y cols., 1993; Rubanyi y cols., 1985*), pero la reducción en la tensión de oxígeno tiene un efecto directo sobre las células musculares lisas vasculares pulmonares (*Murray y cols., 1990; Madden y cols., 1992*).

La teoría más ampliamente aceptada en el momento actual acerca de los mecanismos de la VPH, propone la acción coordinada de un sensor de oxígeno que inicia una vía de señalización que regularía la actividad de proteínas efectoras (teoría redox). El candidato más importante como sensor redox de la VPH es la cadena de transporte electrónico mitocondrial (*Michelakis y cols., 2004*). La inhibición de la cadena respiratoria por la hipoxia daría lugar a cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno, iniciando la vía de señalización. Sin embargo, existe una gran controversia en relación a si la hipoxia aumenta o disminuye la producción de ERO y a si éstas se generan en el complejo I o en el III de la cadena de transporte electrónico (*Moudgil y cols., 2005*). Por otro lado, el candidato fundamental a proteína efectora es el canal de K^+ voltaje-dependientes (Kv). La hipoxia inhibe la corriente de algunos canales Kv, principalmente Kv1.5 y Kv2.1, dando lugar a una despolarización de las células musculares lisas de la arteria pulmonar, apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L, aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y vasoconstricción (*Archer y cols., 2004*). Aunque es conocido que cambios en el estado redox modulan la actividad de canales Kv, los mecanismos implicados no están claros. Se han propuesto varias proteínas como componentes de la señal de transducción de la VPH, específicamente la Rho cinasa, tirosina cinasas independientes de receptor como la src, MAP cinasas como la p38 y la PKC (*Ward y cols., 2004; Tsai y cols., 2004*). Sin embargo, no existen evidencias concluyentes de la participación de ninguna de ellas en la vía de señalización o del nivel en que éstas cinasas podrían participar. Por ejemplo, los animales deficientes

en PKC ϵ presentan una VPH disminuida. Sin embargo, la respuesta reducida a la hipoxia en estos animales parece debida a una sobre-expresión de canales de Kv y no a que la PKC ϵ intervenga en la señal de transducción (*Little y cols., 2003*).

3.4.2 Oxígeno y pulmón perinatal

La circulación fetal pulmonar es sensible a pequeños cambios en la PO₂. La pared vascular pulmonar responde a cambios de 5 mmHg de PO₂ y es la responsable del mantenimiento de la alta resistencia vascular pulmonar intraútero y de la disminución de la resistencia vascular durante el nacimiento (*Abman y cols., 1989b; Blanco y cols., 1988*).

La respuesta pulmonar a la hipoxia en el feto normal es de gran intensidad y se caracteriza por un aumento de las presiones pulmonares arteriales y sistémicas con caída del flujo sanguíneo pulmonar (*Campbell y cols., 1967a; 1967b*). Por otra parte, el aumento en la tensión de O₂ es uno de los principales estímulos de la cascada de acontecimientos que regulan la transición entre la circulación pre y postnatal (*Walker y cols., 1993*). Durante los primeros minutos tras el nacimiento, la PO₂ arterial aumenta de los niveles fetales de 20 mmHg, hasta por encima de 50 mmHg en minutos (*Abman y Stevens, 1996*). El aumento de la presión de O₂ en ausencia de otros estímulos postnatales tales como distensión rítmica del pulmón o la oclusión del cordón umbilical, produce un marcado aumento en el flujo sanguíneo pulmonar fetal (*Titinsky y Morin, 1993; Blanco y cols., 1988*). La reactividad de la circulación fetal pulmonar humana a la hiperoxigenación aumenta con la edad gestacional, pero está ausente antes de la semana 26 de gestación (*Rasanen y cols., 1998*).

Los estudios experimentales que han tratado de dilucidar cuál de los cambios físicos que se producen al nacimiento tiene un papel más relevante en el descenso de las RVP no son completamente concluyentes (*Walker y cols., 1993*). Dawes (*Dawes y cols., 1966*), atribuyó un tercio de la vasodilatación a la ventilación, un tercio a la oxigenación y un tercio al descenso de los niveles de CO₂. Otros estudios han atribuido la casi totalidad de la respuesta exclusivamente a la oxigenación (*Morin y cols., 1988*) o a la ventilación (*Teitel y cols., 1990*). Las respuestas individuales dentro de un grupo de

animales de experimentación, pueden variar entre estos dos extremos (*Teitel y cols., 1990*) y es posible que diferencias en el aclaramiento del líquido pulmonar y en la complianza sean las responsables de las diversas respuestas observadas entre individuos (*Walker y cols., 1993*).

3.4.3 Oxígeno e HPPN

La principal consecuencia de la hipoxia crónica postnatal, tanto en humanos como en animales de experimentación, es la hipertensión pulmonar que tiene lugar como resultado de un incremento del tono vascular, un remodelado estructural del lecho vascular pulmonar y de la policitemia (*Karamsetty y cols., 1995*). Alteraciones de la función endotelial y de la función de las células musculares lisas contribuyen a la etiopatogenia de la hipertensión pulmonar inducida por la hipoxia crónica (*Karamsetty y cols., 1995*). La hipoxia afecta a la fisiología endotelial de diversas maneras, que incluyen la transcripción y la expresión de agentes vasoactivos y moduladores del remodelado vascular (*Raj y Shimoda, 2002*). La hipoxia crónica tiene efectos también sobre las células musculares lisas vasculares, modulando las poblaciones de receptores, la actividad de los canales iónicos y los mecanismos de transducción de la respuesta contráctil (*Villamor y cols., 2004; Raj y Shimoda, 2002*).

Desde las primeras descripciones del síndrome de HPPN, se especuló con el papel etiopatogénico de la hipoxia crónica intrauterina que actuaría incrementando la muscularización de los vasos pulmonares. En recién nacidos fallecidos en fases tempranas por HPPN producida por hipoxia severa intrauterina o intraparto, el análisis histológico demostró una hipertrofia de la media de los vasos (*Haworth y Reid, 1976*). La hipoxia produciría una modulación fenotípica tanto de las células musculares lisas vasculares como de los fibroblastos, con una extensión de la muscularización vascular y un incremento en la densidad de la innervación periarterial (*Hall y cols., 2000; Haworth y Hislop, 2003*). Sin embargo, resulta controvertido y no ha podido ser claramente demostrado en modelos experimentales, el que la hipoxia crónica intrauterina produzca HPPN (*Abman y cols., 1996*). Los primeros estudios demostraron que ratas expuestas a hipoxia en útero tenían un engrosamiento de la media en las arterias pulmonares de

pequeño diámetro (*Goldberg y cols., 1971*). Sin embargo, estudios posteriores, fracasaron en el intento de demostrar las alteraciones morfológicas o hemodinámicas propias de la HPPN tras la hipoxia crónica intrauterina (*Geggel y cols., 1986; Murphy y cols., 1986*). En el embrión de pollo sometido a hipoxia crónica durante la incubación, ésta produjo alteraciones morfológicas y funcionales en los vasos sistémicos pero no en los pulmonares (*Villamor y cols., 2004; Ruijtenbeek y cols., 2000; 2002; 2003a; 2003b*). Por otra parte, modelos experimentales en el feto de cordero que producen hipoxia-isquemia mediante embolización placentaria (*Drummond y cols., 1978*), hipotensión materna (*Gersony y cols., 1976*) o compresión parcial del cordón umbilical (*Soifer y cols., 1987*), sí han sido capaces de reproducir los cambios estructurales propios de la HPPN. Sin embargo, estos modelos son técnicamente dificultosos y se asocian con una alta mortalidad fetal –hasta del 60%–, por lo que han sido abandonados (*Steinhorn y cols., 1997*).

En los últimos años, la hipótesis de Barker (*Barker y cols., 1998*) o de los orígenes fetales de la enfermedad adulta ha producido un gran impacto en el mundo científico (*Villamor y cols., 2004*). Esta hipótesis propone que un ambiente adverso intrauterino produce adaptaciones en el desarrollo que dan lugar a cambios permanentes en la estructura, la fisiología y el metabolismo predisponiendo a los individuos a enfermedades cardiovasculares, metabólicas, endocrinas o neurológicas en la vida adulta (*Miller y cols., 2002; Ruijtenbeek y cols., 2002; Sartori y cols., 1999; Tang y cols., 2000; Barker y cols., 1998*). De modo muy interesante, se ha relacionado la exposición a la hipoxia durante el período perinatal con una mayor susceptibilidad a alteraciones vasculares pulmonares, como la hipertensión pulmonar, en la vida adulta. Así, la exposición perinatal a hipoxia, aumentó la severidad de la hipertensión pulmonar en ratas cuando estas fueron reexpuestas a hipoxia en la vida adulta (*Keith y cols., 2000; Tang y cols., 2000*). Es más, la presencia de una hipertensión pulmonar hipóxica transitoria durante los primeros días de vida en niños recién nacidos, los predispuso a una respuesta exacerbada a la hipoxia en la vida adulta (*Sartori y cols., 1999*). Por tanto, los efectos pulmonares vasculares de la hipoxia parecen ser distintos dependiendo del grado de maduración pulmonar (*Haworth y Hislop, 2003*) y la exposición a la hipoxia durante periodos críticos para el desarrollo y crecimiento pulmonar podría alterar este proceso y producir cambios estructurales y funcionales que provocarían una respuesta exacerbada a posteriores estímulos adversos (*Tang y cols., 2000*).

3.4.4 Estrés oxidativo

a) Radicales Libres de oxígeno y Tono Vascular Pulmonar

El radical libre se define como cualquier especie química que contenga uno o más electrones no apareados. Los radicales libres pueden reaccionar con otras moléculas de forma muy diversa, donando o captando electrones y convirtiéndolas en nuevos radicales libres. Por ello es habitual que las reacciones en las que interviene sean procesos en cadena. Aunque en ocasiones se utiliza el término ERO para denominar a los radicales libres derivados del oxígeno, estos términos no son sinónimos, ya que no todas las ERO -por ejemplo el H_2O_2 - tienen un electrón desapareado y no son por tanto radicales libres. Existen dos fuentes de formación de radicales libres. Una endógena y otra exógena:

- a) La formación endógena de radicales libres tiene lugar principalmente en la mitocondria. Estos orgánulos son los responsables de más del 90% del consumo de oxígeno que se realiza en la célula (*Halliwell y cols., 1985*). Se forman radicales libres en el proceso de fosforilación oxidativa, mediante el cual, la energía de la oxidorreducción del transporte de electrones, es convertida en fosfatos de alta energía (ATP) (*Thannickal y Fanburg, 2000*).

Los fagocitos del sistema inmune son otra fuente de radicales libres. Los polimorfonucleares y los macrófagos, en contacto con un agente infeccioso, experimentan un aumento de su consumo de oxígeno. Este consumo tiene lugar sobre todo en la membrana plasmática y los radicales libres formados, contribuyen a la destrucción del agente infeccioso.

Enzimas microsomales como la citocromo P-450 puede oxidar ácidos grasos insaturados y reducir el oxígeno molecular produciendo radical superóxido (O_2^-) y radical peróxido de hidrógeno (H_2O_2). También en la oxidación peroxisomal de los ácidos grasos se genera hidroperóxido como subproducto.

En el retículo endoplásmico de las células, existen enzimas que catalizan una serie de reacciones cuyos productos finales serán radicales libres. Enzimas como la xantinoxidasa, adenilatooxidasa, triptófano dioxigenasa, pueden generar

radicales libres a través de las citocromo oxidases y también se generan radicales libres por los componentes celulares implicados en la inflamación, tanto autóctonos como los atraídos por la inflamación desde sitios distantes como son los neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos activados (*Sedwick y cols., 1988*).

- b) La formación exógena de radicales libres se produce por la acción sobre el agua de radiaciones ionizantes (Rx; radiaciones gamma), y en situaciones de hiperoxia.

Las principales fuentes de generación de ERO en los sistemas biológicos podemos resumirlas en la siguiente tabla (*Tabla 4*):

Tabla 4. Fuentes de especies reactivas de oxígeno (*Kunsch y cols., 1999*)

FUENTE	LOCALIZACION
Lipoxigenasa Ciclooxigenasa NADPH oxidasa	Membrana plasmática
Sistema de transporte de electrones	Mitocondria
Xantina Oxidasa Hemoglobina Catecolaminas Riboflavina Metales de transición ($\text{Fe}^{2+/3+}$, Cu^{+2+})	Citosol y/o medio extracelular
Oxidasas Flavoproteínas	Peroxisoma
Citocromo p ₄₅₀	Retículo endoplásmico

Todos los átomos o moléculas pueden transformarse en radicales libres, sin embargo, los que presentan un mayor interés desde un aspecto biológico son los radicales libres de oxígeno. Procedemos a analizar los más activos:

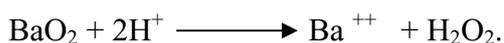
1.- Radical superóxido (O_2^-): se origina a partir de la ionización del radical perhidroxilo por ganancia de un electrón (reducción) por parte del oxígeno. Es una especie química altamente reactiva y muy tóxica.



La producción principal del radical superóxido se realiza durante el proceso de oxidación mitocondrial. Aproximadamente entre 1-2% de todo el oxígeno mitocondrial no sigue el proceso de óxido-reducción de la cadena respiratoria, formándose este radical libre (*McCord y cols., 1983*). Este juega un papel en la defensa antibacteriana mediante la fagocitosis.

También puede formarse por otros mecanismos enzimáticos en los que se implican la aldehído oxidasa, purina oxidasa o xantino oxidasa.

2.- Radical peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se obtiene por acción de determinados ácidos sobre el peróxido de bario.



Thenard (1818), su descubridor, lo llamó agua oxigenada, la forma menos activa y menos tóxica de los derivados del oxígeno. Puede formarse tanto por reducción directa del oxígeno por dos electrones como por la dismutación del ión superóxido mediante la enzima superóxido dismutasa. No son propiamente radicales libres, porque no poseen electrones desapareados. Pero tienen una alta tendencia a convertirse en ellos e inducir reacciones oxidativas en cadena al aceptar electrones procedentes de metales reducidos como el Fe^{++} y el Cu^+ .

Aunque el H_2O_2 es un agente menos oxidante que el O_2^- , en presencia de iones metálicos, por ejemplo de Fe^{++} , se forma el radical OH^{\cdot} , que es altamente reactivo y tóxico.

3.- Radical Hidroxilo. (OH^\cdot). Es una de las moléculas que mayor reactividad química presenta, es capaz de reaccionar prácticamente con todas las sustancias orgánicas. Es el radical responsable de la destrucción de importantes moléculas. Puede aparecer en los procesos biológicos como consecuencia de distintas reacciones:

a) La acción de los rayos X o de las radiaciones gamma sobre el agua producen una disociación de la misma con aparición del radical hidroxilo (radiolisis del agua). Su alta reactividad le hace tender a reaccionar con otra molécula similar produciendo agua oxigenada (H_2O_2).

b) Por reducción del agua oxigenada por iones metálicos, en especial el ión ferroso (Fe^{++}):



La importancia de esta reacción en los seres vivos radica en la abundancia del hierro en el organismo.

4.-El NO como radical libre: El NO es un radical libre al tener un electrón desapareado. El papel del NO como radical libre se comenta en el apartado 3.1.

b) Daño celular originado por las ERO

Los lípidos, los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono y las proteínas son susceptibles al ataque de los radicales libres, sufriendo daño oxidativo *in vivo*. La peroxidación lipídica es uno de los mayores efectos del estrés oxidativo y va a producir daño celular por la modificación de las propiedades físico-químicas de la membrana, lo que altera su permeabilidad y el control de la homeostasis iónica celular. También se ha descrito en la etiopatogenia de estos cambios de la homeostasis iónica la oxidación de los grupos sulfidrilo de las proteínas implicadas en el transporte iónico y en la inhibición de la síntesis de ATP. Además se postula que el estrés oxidativo podría incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y activar diversas fosfolipasas y proteasas, lo que conduciría a fenómenos de necrosis o de apoptosis celular (*Halliwell y cols., 1992; Li y cols., 2000; Peiro y cols., 2000; Thannickal y cols., 2000*).

El pulmón es el primer órgano susceptible de daño oxidativo, sobre todo en el momento del nacimiento, al iniciarse la respiración atmosférica y cuando el recién nacido es sometido a oxigenoterapia o ventilación mecánica. El pulmón es el primer lugar de generación de oximetabolitos que podrían modular el tono vascular de las arterias pulmonares. Los radicales libres de O_2 actúan a nivel vascular tanto de un modo directo como a través de la liberación de otros mediadores vasoactivos. Se ha demostrado que algunos radicales libres producen contracción directa de los vasos pulmonares. El O_2^- y el H_2O_2 , son capaces de modular las respuestas contráctiles y vasodilatadoras. Estimulan la contracción mediante la movilización de los depósitos intracelulares de Ca^{++} (Touyz y cols., 2000). Por otra parte, los radicales libres promueven el metabolismo del ácido araquidónico. Muchos de los pasos del metabolismo del ácido araquidónico se acompañan de la generación de radicales libres, lo que en cierto modo supone un mecanismo de retroalimentación positiva (Holtzman y cols., 1991).

c) Defensas antioxidantes

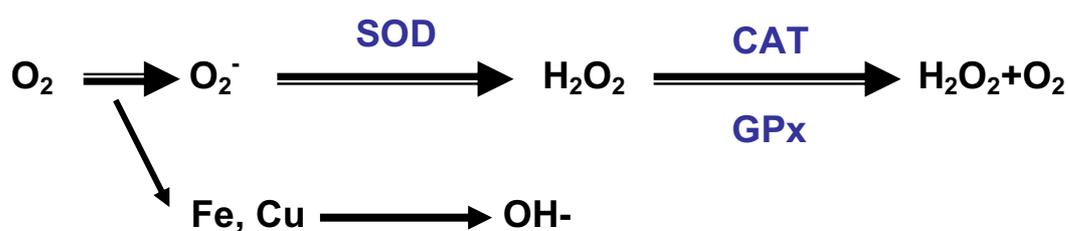
Las células están equipadas con un amplio repertorio de enzimas antioxidantes, así como de pequeñas moléculas antioxidantes, la mayoría derivadas de la ingesta diaria de frutas o verduras. Según su mecanismo de acción las defensas antioxidantes se dividen en enzimáticas y no enzimáticas:

-ENZIMÁTICAS:

Las enzimas antioxidantes son el mecanismo defensivo primario más importante frente a los radicales libres. Existen muchos estudios experimentales que ponen de manifiesto la importancia y las variaciones de dichos enzimas en situaciones de hiperoxia, si bien, no está claro el papel que juegan en muchas situaciones clínicas (Pedraz, 1999). En la etapa final de la gestación, existe una elevación de los enzimas antioxidantes fetales paralela a la maduración del sistema del surfactante pulmonar, como preparación frente al estrés que el nacimiento

representa (Radi, 1993). Tras el nacimiento, disminuyen los niveles de las enzimas antioxidantes y permanecen estables hasta que finaliza el periodo de crecimiento y de desarrollo pulmonar. Posteriormente, con la edad, se incrementa de nuevo la actividad de estos sistemas enzimáticos y aumenta su capacidad de activación en condiciones de hiperoxia, lo que confiere cierta tolerancia ante las situaciones de alto estrés oxidativo.

1. “Barredores (o “Scavengers”) enzimáticos”, tales como la SOD, que favorece la dismutación del radical superóxido a hidroperóxido y la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx), que convierten el hidroperóxido en agua y O_2 .



2. Los enzimas implicados en la reducción de las formas oxidadas de antioxidantes endógenos, como la GSH (glutatión reducido) reductasa o la dehidroascorbato reductasa, o los responsables del mantenimiento de los tioles proteicos, como la tioredoxín reductasa.

-NO ENZIMÁTICAS

Existen varias sustancias que no presentan actividad enzimática pero tienen capacidad antioxidante como son las vitaminas E y C, los carotenos y la ceruloplasmina, barredores de radicales hidrofílicos tales como el ascorbato, el urato y el glutatión, barredores de radicales lipofílicos tales como los tocoferoles, los flavonoides, los carotenoides y el ubiquinol.

d) Importancia de los Radicales Libres de Oxígeno durante el período neonatal

El nacimiento supone el paso de un ambiente cálido e hipóxico a uno frío y relativamente hiperóxico, lo que trae consigo un incremento considerable del estrés oxidativo, que va a ser particularmente agresivo en el prematuro (*Rodrigues, 1998; O'donovan y Fernández, 2004*). Por tanto, el recién nacido y particularmente el pretérmino es especialmente sensible a la acción patógena de los radicales libres. Los radicales libres van a desempeñar un papel determinante en entidades neonatológicas tales como la displasia broncopulmonar, la retinopatía del prematuro, la enterocolitis necrotizante, la asfíxia perinatal o la hemorragia intracerebral (*Rodrigues, 1998; O'donovan y Fernández, 2004*). Esto ha llevado a algunos autores como Saugstad a acuñar el término “Enfermedad por Radicales de Oxígeno” en neonatología, para agrupar todas estas entidades bajo un concepto común en el que el desequilibrio estrés oxidativo-defensas antioxidantes es el núcleo etiopatogénico (*Saugstad, 1996; Rodrigues, 1998; O'donovan y Fernández, 2004*).

4.- ISOPROSTANOS: ¿Nuevos mediadores vasoactivos en la fisiología y patofisiología neonatal?

4.1 Definición, mecanismos de producción. Nomenclatura.

4.2 Los isoprostanos como marcadores de estrés oxidativo

4.3 Isoprostanos y estados fisiológicos

4.4 Isoprostanos y enfermedad

4.4.1 Pulmonar

4.4.2 Enfermedad cardiovascular

4.4.3 Otras enfermedades

4.5 Isoprostanos en la fisiología y patofisiología perinatal

4.6. Biología vascular de los isoprostanos.

4.6.1 Efectos vasculares de los isoprostanos

4.6.2 Vasos sistémicos

4.6.3 Vasos pulmonares

4.6.4 Receptores vasculares de los isoprostanos

4.6.5 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil a isoprostanos

4.6.6 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante mediada por isoprostanos

4.- ISOPROSTANOS: ¿Nuevos mediadores vasoactivos en la fisiología y patofisiología neonatal?

4.1 Definición, mecanismos de producción. Nomenclatura.

Los isoprostanos son compuestos similares a las PG que se producen de forma independiente de la COX, mediante un mecanismo no enzimático de peroxidación del ácido araquidónico inducido por radicales libres (Roberts y Morrow, 1997; Morrow y cols., 1999) (**Figura 6**). Se describieron por primera vez por Morrow y cols. en 1990 (1990a) y se han considerado desde hace tiempo como marcadores del estrés oxidativo en varias enfermedades inflamatorias y degenerativas (Roberts y Morrow, 1997). Sin embargo, debido a su semejanza estructural con las PG desde un primer momento se sospechó que pudieran tener actividad biológica específica, (Roberts y Morrow, 1997).

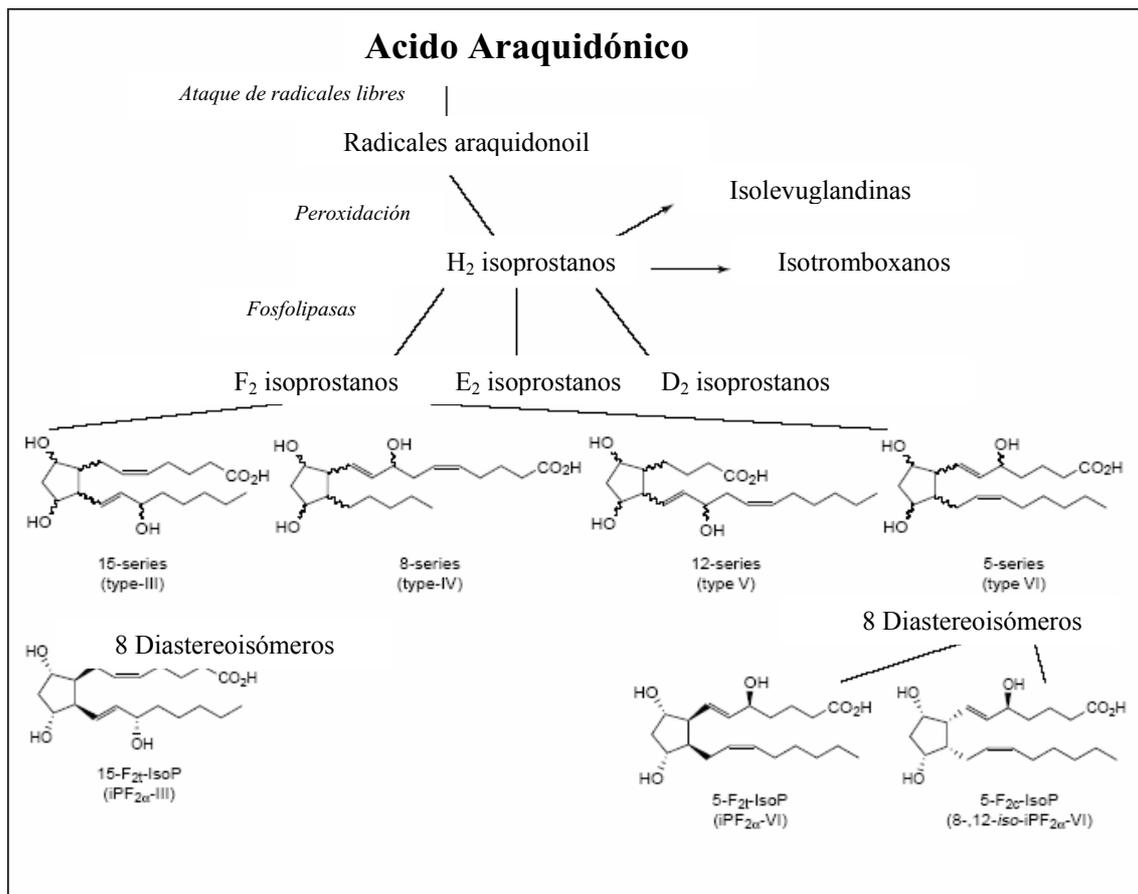


Figura 6. Vía de formación de los Isoprostanos

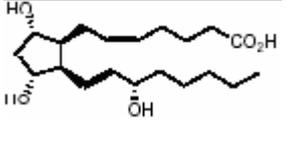
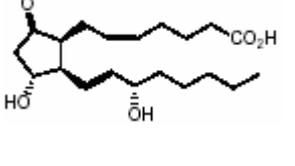
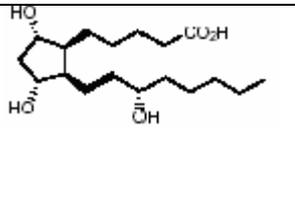
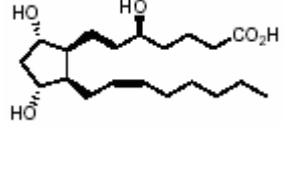
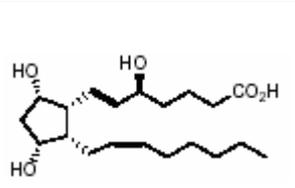
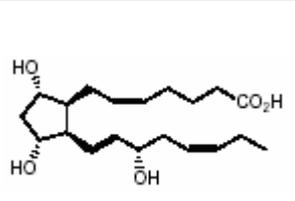
Producción de isoprostanos:

Los isoprostanos se generan tanto a partir de moléculas libres de ácido araquidónico (*Morrow y cols., 1990a;1990b*), como a partir de la esterificación de los lípidos de membrana (*Morrow y cols., 1994*). Se ha sugerido también que el isoprostano 8-*iso* PGF_{2α} pudiera ser un producto derivado de la COX (*Practico y cols., 1995*).

En la génesis de los isoprostanos intervienen las especies reactivas de oxígeno. Éstas tienen la capacidad de sustraer un átomo de hidrógeno del ácido araquidónico, lo que da lugar a la formación de cuatro isómeros de la PGH₂. Cada uno de estos cuatro isómeros, puede ser completamente reducido, dando lugar a cuatro isómeros diferentes de la PGF_{2α} o parcialmente reducido, dando lugar a isómeros de la PGE₂ o PGD₂. Debido a que los isoprostanos se diferencian estructuralmente de las prostaglandinas en que en los primeros las cadenas laterales tienen predominantemente orientación *cis* de la unión del anillo prostano, mientras que las últimas poseen exclusivamente cadenas en posición *trans* (*Morrow y cols., 1990a; 1990b*), se adoptó una nomenclatura en paralelo a la de las prostaglandinas para los primeros isoprostanos en ser descritos. Así, se denominaron, por ejemplo, como 8-*iso* PG u 8-*epi* PG. Sin embargo, esta nomenclatura no permite la diferenciación de las numerosas estructuras isoméricas, por lo que se han propuesto otras dos nomenclaturas diferentes para los isoprostanos (**Tabla 5**).

La nomenclatura de Taber (*Taber y cols., 1997*) se formuló de acuerdo con el “Eicosanoid Nomenclature Committee” y fue aprobada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Los compuestos se denominan series 5, 12, 8 ó 15 según a qué átomo de carbono se ha unido la cadena lateral hidroxilo (*Taber y cols., 1997*). Los IsoPs que contienen el anillo prostano tipo F son isoméricos a PGF_{2α} y por tanto se refieren como F₂-IsoPs. De igual forma se pueden reorganizar para formar regioisómeros de prostaglandina E₂ y D₂. Se pueden crear otras clases de IsoPs a partir de la peroxidación del ácido araquidónico, incluyendo los que poseen anillos prostanos tipo A y J.

Tabla 5. Diferentes nomenclatura propuestas para los isoprostanos.

Estructura química	Nomenclatura habitual	Nomenclatura Taber	Nomenclatura Rokach
	8- <i>iso</i> PGF _{2α}	15-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -III
	8- <i>iso</i> PGE ₂	15-E _{2t} -IsoP	iPE _{2α} -III
	2,3dior-5,6-dihidro – 8- <i>iso</i> PGF _{2α}	2,3dior-5,6-dihidro – 15-F _{2t} -IsoP	2,3dior-5,6-dihidro – iPF _{2α} -III
	No disponible	5-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -VI
	No disponible	5-F _{2c} -IsoP	8-,12- <i>iso</i> – iPF _{2α} -VI
	8- <i>iso</i> PGF _{3α}	5-F _{3t} -IsoP	iPF _{3α} -III

Se ha propuesto un sistema de nomenclatura alternativa para los isoprostanos por Rokach y cols. (1997). En ésta, se usa la abreviatura iP para denominar a los isoprostanos. Los regioisómeros se denominan III-VI dependiendo de la estructura. Esta nomenclatura se modificó en 1997, para que pudiera ser aplicada a los compuestos

similares a los isoprostanos derivados del ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico (*Rokach y cols., 1997*).

4.2 Los isoprostanos como marcadores de estrés oxidativo:

La cuantificación del estrés oxidativo resulta de gran relevancia para la comprensión de numerosos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos. Es por ello que diversos grupos de investigadores se han centrado en la búsqueda de marcadores fiables de este proceso. Al ser los isoprostanos productos secundarios de la peroxidación lipídica, cuantificables y de gran estabilidad química, se ha llevado a cabo su medición en orina (*Reilly y cols., 1996*), plasma (*Morrow y cols., 1995*), líquido céfalo-raquídeo (*Montine y cols., 1999*), condensación espiratoria (*Montuschi y cols., 1999a;199b*), lavado broncoalveolar (*Montuschi y cols., 1998*) o de forma esterificada en membranas titulares o en partículas lipídicas circulantes (*Morrow y cols., 1995*). Aparte de ser marcadores de la peroxidación lipídica, la cuantificación de los isoprostanos ha sido propuesta como marcador pronóstico en determinadas patologías como el fallo cardiaco (*Mallat y cols., 1998; Cracowski y cols., 2000a; 2001*) y como una herramienta para la evaluación de la terapia antioxidante (*Davi y cols., 1997*).

Los métodos cromatográficos son el “patrón oro” para la cuantificación de los isoprostanos. Los problemas más importantes de estos métodos de cuantificación son el coste y la dificultad técnica que conllevan, por lo que resultan difícilmente aplicables como métodos de rutina. Es por ello que se han desarrollado también técnicas de inmunoensayo para detección de isoprostanos.

En el siguiente capítulo desarrollaremos en detalle el papel que los isoprostanos tienen, bien como marcadores de estrés oxidativo, bien como agentes etiopatogénicos en diversas entidades cardiovasculares, metabólicas, pulmonares o neurológicas.

4.3 Isoprostanos y estados fisiológicos:

El hallazgo de niveles significativos de isoprostanos en tejidos y fluidos biológicos de animales y humanos sin patología indica que en ellos tiene lugar una peroxidación lipídica que se suprime de forma incompleta por las defensas antioxidantes. Un criterio clave para el establecimiento de los isoprostanos como biomarcadores es el conocimiento adecuado de sus concentraciones y de las variaciones que éstas sufren en condiciones fisiológicas. Hasta la fecha, la mayoría de los datos que disponemos, se limitan al 8-*iso* PGF_{2α}.

La concentración de isoprostanos varía con la edad y el sexo. Dos estudios sugieren que los niveles urinarios de 8-*iso* PGF_{2α} están elevados en varones jóvenes sanos comparados con mujeres premenopáusicas (*Ide y cols., 2002*) y más elevados en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas (*Helmersson y cols., 2002*). En la rata, también se ha comprobado esta diferencia con la edad en las concentraciones plasmáticas de F₂ isoprostanos y los niveles de F₂ isoprostanos esterificados en lípidos (*Roberts y cols., 2001*). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el proceso normal de envejecimiento se podría deber al aumento del daño oxidativo de moléculas biológicas relevantes (*Rokach y cols., 1997; Feillet-Coudray y cols., 1999*)

No parecen existir diferencias circadianas en las concentraciones urinarias de isoprostanos. Del mismo modo, el contenido lipídico de la dieta no parece tampoco modificar los niveles de estos compuestos (*Morrow y cols., 1990; Richelle y cols., 1999; Gopaul y cols., 2000*).

El ejercicio físico es una importante fuente de estrés oxidativo. Diversos estudios han demostrado incrementos de los niveles de isoprostanos tras ejercicio intenso en humanos (*Mastaloudis y cols., 2001*), en perros (*Hinchcliff y cols., 2000*) y en caballos (*Kirschvink y cols., 2002*). El ejercicio moderado, sin embargo, no parece tener estos efectos (*Mori y cols., 1999*).

4.4 Isoprostanos y enfermedad

Los procesos de peroxidación lipídica han sido caracterizados por los bioquímicos desde hace muchas décadas. Sin embargo, sólo en los últimos 30 años, se ha comenzado a reconocer su posible importancia biológica. Desde entonces, un aumento de la peroxidación lipídica se ha involucrado en la patofisiología de enfermedades tan diversas como la arteriosclerosis, la diabetes o el Alzheimer. El reconocimiento de los isoprostanos como marcadores químicos estables y fácilmente mensurables de peroxidación lipídica, ha traído consigo un exponencial aumento de trabajos de investigación en los que las concentraciones de isoprostanos han sido medidas.

4.4.1 Pulmonar

Se han cuantificado niveles elevados de isoprostanos en pacientes con asma (*Dworski y cols., 2000; FitzGerald y cols., 2000; Montuschi y cols., 1999b; 1999c; Janssen, 2001*), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (*Practico y cols., 1998a*), enfermedad pulmonar intersticial (*Montuschi y cols., 1998*), fibrosis quística (*Collins y cols., 1999; Montuschi y cols., 2000*), síndrome de distrés respiratorio agudo (*Carpenter y cols., 1998*) y fallo respiratorio grave (*Goil y cols., 1998*). También se ha encontrado aumento de isoprostanos tras la exposición al humo de cigarro (*Chiabrando y cols., 1999; Delanty y cols., 1996; Morrow y cols., 1995; Practico y cols., 1998a; Reilly y cols., 1996*), alérgenos (*Dworski y cols., 2000; Montuschi y cols., 1999b*), ozono (*Hazbun y cols., 1993*) o hiperoxia (*Vacchiano y cols., 1998; Vacchiano y cols., 1994*).

El estrés oxidativo parece desempeñar un papel importante en la patofisiología del asma (*Henricks y cols., 2001*). Se ha encontrado un aumento de los niveles de isoprostanos en el aire espirado de pacientes asmáticos (*Montuschi y cols., 1999b; Baraldi y cols., 2003*). Estas determinaciones resultan relevantes porque abren paso a un método no invasivo, que pudiera ser útil para detectar daño oxidativo local en tejidos pulmonares. Además podría aportar una nueva evidencia del papel del estrés oxidativo y la peroxidación lipídica secundaria a la inflamación de la vía aérea producida por alérgenos y ofrecer una interesante herramienta de evaluación de los efectos del tratamiento.

Los niveles de F₂ isoprostanos aumentan en plasma, orina, linfa y aire espirado en fumadores (*Bachi y cols., 1996; Reilly y cols., 1996; Obata y cols., 2000; Morrow y cols., 1995; Sinzinger y cols., 2000; Montuschi y cols., 2000*). Este aumento se reduce después de dos semanas de abstinencia al tabaco (*Reilly y cols., 1996; Meagher y cols., 1999*) y casi alcanza valores de no fumadores 4 semanas después de dejar el tabaco (*Oguogho y cols., 2000*). No queda clara la relación entre la cantidad de cigarrillos fumados y los niveles detectados de isoprostanos. Esto sólo se ha visto en un trabajo (*Reilly y cols., 1996*), pero no en el resto (*Obata y cols., 2000; Morrow y cols., 1995*). Volver a fumar después de haberlo dejado, se asocia a un aumento de los niveles de isoprostanos en plasma y orina (*Chehne y cols., 2001*).

4.4.2 Enfermedad cardiovascular

Se han encontrado niveles elevados de isoprostanos en entidades como la angina inestable (*Cipollone y cols., 2000*), el infarto miocardio (*Mallat y cols., 1998*), coronariopatías (*Mehrabi y cols., 1999; Van Kooten y cols., 1997*), la hipercolesterolemia (*Davi y cols., 1997*), la preeclampsia (*Barden y cols., 1996; Staff y cols., 1999*) y la aterosclerosis (*Practico y cols., 1997; Practico y cols., 1998b*). La concentración urinaria de la 8-iso PGF_{2α} aumenta también en diversos factores de riesgo cardiovascular tales como el tabaquismo (*Reilly y cols., 1996; Morrow y cols., 1995*), la diabetes (*Davi y cols., 1999; Gopaul y cols., 1995*), la hipercolesterolemia (*Davi y cols., 1997; Reilly y cols., 1998*) y la hiperhomocistinemia (*Voutilainen y cols., 1999*). Se mantiene la hipótesis de que los isoprostanos pudieran contribuir a la formación de la placa ateromatosa en la pared vascular (*Cayatte y cols., 2000; Yura y cols., 1995*) aunque hay estudios que lo desestiman (*Raal y cols., 1999; Sarabi y cols., 1999*). Varios grupos, han estudiado la formación de F₂-IsoPs en lipoproteínas de baja densidad (LDLs) expuestas a varias condiciones oxidativas *in vitro*. El interés de esto radica en que la oxidación de LDL *in vivo* da lugar a una forma aterogénica que es captada por los macrófagos en la pared del vaso, lo que resulta crucial en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis en humanos (*Steinberg y cols., 1989*). También contribuye a soportar esta hipótesis el hecho de que algunos isoprostanos, particularmente la 8-iso PGF_{2α}, sean potentes vasoconstrictores e inductores de mitogénesis en las células musculares lisas vasculares (*Morrow y Roberts 1997*).

4.4.3 Otras enfermedades

Existe una considerable evidencia sobre la participación de los procesos de oxidación lipídica en la inflamación (*Tsimihodimos y cols., 2002*). En diversas enfermedades inflamatorias, como en el Crohn, la esclerosis sistémica (*Montuschi y cols., 1999a; Wood y cols., 2000; Pratico y cols., 1998a; Cracowski y cols., 2001b*) o lupus eritematoso sistémico (*Iuliano y cols., 1997*) los niveles de F₂ isoprostanos se encuentran elevados.

Los niveles de isoprostanos se encuentran también elevados en diversas entidades neurológicas como en la enfermedad de Alzheimer (*Montine y cols., 1999*), la esclerosis múltiple (*Greco y cols., 1999*), la enfermedad de Huntington (*Cracowski y cols., 2002*), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (*Cracowski y cols., 2002*) y en la lesiones medulares, metabólicas como la diabetes tipo 1 y 2, o nefrológicas como la insuficiencia renal crónica (*Cracowski y cols., 2002*) (**Tabla 6**). En algunas de estas enfermedades, se ha encontrado una relación entre la mejoría clínica y la reducción de los niveles de isoprostanos. Esto se interpreta como una prueba de la participación fisiopatológica del estrés oxidativo. Hasta el momento, sin embargo, resulta difícil establecer un papel real de los isoprostanos que vaya más allá del reflejo de la situación de estrés.

Tabla 6. Resumen de los estados fisiopatológicos en los que se han determinado niveles de F₂ isoprostanos como marcadores.

Área de estudio	Niveles isoprostanos F ₂	
	Aumentados	Invariables
Metabolismo lipídico	Hipercolesterolemia familiar homocigota y heterocigota.	Hipercolesterolemia tipo IIa (niños)
Diabetes	Diabetes tipo 1 y 2	Diabetes tipo 1 con excreción de albúmina urinaria normal
Hiperhomocistinemia	Homocistinuria homocigota e hiperhomocistinemia moderada	-
Enfermedad cardiovascular	Fallo cardíaco, aterosclerosis, ruptura de aneurisma abdominal aórtico, infarto miocárdico, angioplastia coronaria, angina inestable, bypass cardiopulmonar	Enfermedad coronaria estable, test de esfuerzo positivo, pacientes sintomáticos vs asintomáticos con estenosis carotídea
Enf. Sistémica e inflamatoria	Esclerosis sistémica (escleroderma), lupus eritematoso sistémico, síndrome anticuerpo antifosfolípido, enfermedad inflamatoria reumática, rabdomiolisis.	Síndrome de Raynaud
Patología intestinal y hepática	Cálculos biliares, pancreatitis, cirrosis hepática, Enf. de Cronh	-
Patología pulmonar	Fibrosis quística, asma, Enf. Pulmonar Obstructiva Crónica, SDRA, fallo respiratorio (aspirados traqueales en niños), enfermedad pulmonar intersticial, HAP.	-
Patología neurológica	Enf. de Alzheimer, Enf. de Huntington, Enf. de Creutzfeldt-Jakob, Sdme. Down, daño de médula espinal.	Enf. de Alzheimer, Enf. de Huntington, infarto agudo isquémico, migraña.
Enfermedad nefrológica	Hemodiálisis	Sdme. nefrótico, trasplante renal.
Patología obstétrica	Pre-eclampsia, distrés fetal y vuelta de cordón prieta.	Pre-eclampsia.

4.5 Isoprostanos en la fisiología y patofisiología perinatal

Como hemos señalado repetidamente, los isoprostanos se van a encontrar elevados en aquellas situaciones en las que el estrés oxidativo -en general- y la peroxidación lipídica -en particular- se encuentran aumentadas. Este hecho hace del período perinatal un momento de la vida particularmente interesante para la producción y eventualmente la acción de los isoprostanos. En el momento del nacimiento se produce un marcado aumento en la saturación arterial de oxígeno, con el consiguiente incremento del estrés oxidativo. Por otra parte, como hemos señalado previamente, en los últimos años se han acumulado evidencias de que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en diversas enfermedades neonatales como la displasia broncopulmonar (DBP), la retinopatía del pretérmino (ROP), la enterocolitis necrotizante, la hemorragia intraventricular (HIV) o la leucomalacia periventricular (*Ahola y cols., 2004; Saugstad y cols., 2001*).

Los niveles de isoprostanos fueron significativamente mayores en recién nacidos cuando se compararon con adultos. De manera interesante, los pretérminos, mostraron niveles de isoprostanos mayores que los niños a término (*Comporti y cols., 2004*).

El estrés fetal y la asfixia perinatal, también han sido relacionados con un incremento en los niveles de isoprostanos (*Qin y cols., 2000*). Es más, en un modelo de asfixia perinatal en ratas se ha descrito una correlación entre el incremento de niveles de isoprostanos en tejido cerebral y las secuelas neurológicas que presentaron los animales (*Calamandrei y cols., 2004*). La concentración plasmática de isoprostanos también se encontró elevada en recién nacidos pretérmino que posteriormente desarrollaron Leucomalacia Periventricular o DBP (*Ahola y cols., 2004*). También en recién nacidos con fallo respiratorio hipóxico, se han correlacionado la presencia de isoprostanos en el aspirado traqueal con la severidad del trastorno.

4.6. Biología vascular de los isoprostanos.

4.6.1 Efectos vasculares de los isoprostanos:

Debido a su semejanza estructural con las prostaglandinas, desde los primeros momentos de su descripción, se ha sospechado que los isoprostanos pudieran tener efectos sobre el tono vascular y la agregación plaquetaria semejantes a los de éstas. Es por ello que los efectos de los isoprostanos han sido estudiados exhaustivamente en numerosos territorios vasculares de diversas especies. Los efectos encontrados abarcan desde una potente vasoconstricción a una completa relajación del músculo liso vascular y van a variar dependiendo del compuesto, la especie y el tipo de vaso estudiado (*Tabla 7*).

4.6.2 Vasos sistémicos.

El compuesto más ampliamente estudiado ha sido la 8-*iso* PGF_{2α}, al ser éste uno de los primeros en estar disponible comercialmente. Tanto este compuesto como de la 8-*iso* PGE₂ desencadenan efectos constrictores prácticamente en cada lecho vascular analizado, tales como las arterias aorta, carótida, coronarias, cerebrales, piales, pulmonares, renales y retinianas. Estas propiedades constrictoras no son exclusivamente vasculares ya que se han demostrado también en, por ejemplo, los vasos linfáticos, el tracto gastrointestinal y el útero (*Cracowski y cols., 2002*).

Hay numerosos trabajos que han comparado la potencia vasoconstrictora de 8-*iso* PGF_{2α} con el análogo del Tromboxano A₂ (U46619) y en todos se confirma que por orden de potencia, el U46619 es más potente que 8-*iso* PGF_{2α} y éste mucho más que su isómero la PGF_{2α}. Parece ser que la vasoconstricción generada por 8-*iso* PGF_{2α} resulta mayor en los vasos de menor tamaño que en las arterias de conducción.

En estudios realizados en arterias renales y arteriolas piales de rata, la 8-*iso* PGE₂ resultó ser un vasoconstrictor menos potente y eficaz que la 8-*iso* PGF_{2α} (*Fukunaga y cols., 1993a; Hoffman y cols., 1997*). Sin embargo, la potencia de los dos isoprostanos fue idéntica en coronarias de cobaya (*Möbert y cols., 1997*) y algunos autores han demostrado que la 8-*iso* PGE₂ es más potente que la 8-*iso* PGF_{2α} en anillos aislados de oreja de conejo (*Sametz y cols., 1999*), aorta torácica de rata (*Sametz y cols., 2000*),

arterias umbilicales humanas (Oliveira y cols., 2000) y arterias mamaria interna de humanos (Cracowski y cols., 2001) . Además, la inyección intravenosa de 8-iso PGE₂ resultó ser más eficaz que la de 8-iso PGF_{2α} en elevar la tensión arterial en ratones (Audoly y cols., 2000).

Aunque en general y como ya hemos comentado, la mayor parte de las investigaciones describen vasoconstricción mediada por los isoprostanos, Zhang y cols. (2003) demostraron que en arterias coronarias porcinas contraídas con el análogo del TXA₂ el U46619, la 8-iso PGE₂ , la 8-iso PGE₁ y la 8-iso PGF_{2β} indujeron relajación que fue particularmente potente en el caso del primer compuesto.

4.6.3 Vasos pulmonares.

Janssen y cols. (2001) examinaron la respuesta de siete isoprostanos diferentes, dos con anillo E (8-iso PGE₁ y 8-iso PGE₂) y cinco con anillo F (8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{1β}, 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGF_{2β}, y 8-iso PGF_{3α}), en arterias y venas pulmonares de pequeño diámetro humanas y caninas. La 8-iso PGE₂ resultó ser el más potente y efectivo en arterias pulmonares humanas y su contracción fue de forma aproximada equivalente a la 8-iso PGF₂ en venas pulmonares y hasta tres veces más potente que las producidas por el cloruro potásico. Los otros isoprostanos fueron débilmente efectivos o inefectivos como vasoconstrictores (Janssen y cols., 2001).

Otros trabajos del mismo grupo (Janssen y cols., 2002; Tazzeo y cols., 2003) evaluaron la respuesta de las arterias y venas pulmonares adultas porcinas a 8-iso PGE₁, 8-iso PGE₂ 8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β}, encontrando efectos vasoconstrictores con una particular potencia y eficacia de 8-iso PGE₂. En general, los isoprostanos con anillo F, indujeron contracciones mucho más débiles que los isoprostanos con anillo E.

En los vasos pulmonares también se ha descrito vasodilatación mediada por isoprostanos. Concretamente Jourdan y cols. (1997) describen relajación de arteria pulmonar de rata por la 8-iso PGF_{2α}. Del mismo modo, Janssen y cols. (2001), describen relajación mediada por 8-iso PGE₁ en arterias pulmonares caninas y en venas pulmonares caninas y humanas. Sin embargo, este efecto relajante de 8-iso PGE₁ solamente pudo observarse tras el bloqueo del receptor TP.

Tabla 7. Tabla resumen de los isoprostanos más frecuentemente estudiados *in vitro*, en la que se especifica el autor y el año de publicación, así como el efecto desencadenado en el vaso del órgano correspondiente según la especie en estudio.

Autor	Año	Vaso/Órgano/ Especie	Efectos Vasculares	Isoprostanos estudiados
Morrow	1990	Vasos renales rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Banerjee	1992	Vasos pulmonares conejo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Takahashi	1992	Arterias Glomerulares rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Fukunaga	1993	Vasos renales rata	Vasoconstricción	8-iso PGE ₂
Kang	1993	Vasos renales rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Crankshaw	1995	Miometrio humano	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Mohler	1996	Carótida cerdo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Kawikova	1996	Vía aérea, Cobayo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Jourdan	1997	Arteria pulmonar rata	Vasoconstricción, Vasorelajación	8-iso PGF _{2α}
Wagner	1997	Anillos aórticos y pulmonares de rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Möbert	1997	Corazón aislado cobayo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGE ₂
John	1997	Arteria pulmonar rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Hoffman	1997	Arteriolas piales rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Truog	1997	Vasos pulmonares cerdo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Marley	1997	Vena porta rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Lahaie	1998	Vasos retinianos lechones	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Mobert	1998	Coronarias cobayo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Kromer	1998	Aorta rata	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
	1996, 1999	Coronaria vaca,cerdo,oveja adultos		
Wilson	1999	Art. Coronaria cerdo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Sametz	1999, 2000	Arteriolas oreja conejo	Vasoconstricción	8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{2α}
Audoly	2000	Ratas enteras	Vasoconstricción	8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{2α}
Hou	2000	Microvasos inmaduros periventriculares cerdo	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Oliveira	2000	Art. Umbilical humana	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGE ₂
Gardan	2000	Vena safena humana	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Cracowski	2000	Art. Mamaria interna humana	Vasoconstricción	8-iso PGF _{2α}
Janssen	2000	Vasos pulmonares humanos y caninos	Vasorelajación	8-iso PGE ₁ , 8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{1α} , 8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGF _{2β}
	2001	Vasos pulmonares humanos y caninos	Vasoconstricción	8-iso PGE ₁ , 8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{1α} , 8-iso PGF _{3β} , 8-iso PGF _{1β} , 8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGF _{2β}
	2002	Vasos pulmonares cerdo adulto	Vasoconstricción	8-iso PGE ₁ , 8-iso PGE ₂ , 8-iso PGF _{1α} , 8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGF _{2β}
Zhang	2003	Coronaria cerdo adulto	Vasorelajación	8-iso PGF _{2α} , 8-iso PGE ₁ , 8-iso PGF _{2β}
Belik	2003, 2004	Arteria pulmonar ratas recién nacidas	Vasorelajación	8-iso PGF _{2α}

4.6.4 Receptores vasculares de los isoprostanos.

Ya hemos comentado repetidamente las semejanzas estructurales existentes entre los isoprostanos y sus isómeros las prostaglandinas. Este hecho condujo a la sospecha de que los efectos vasculares de los isoprostanos estarían mediados por los receptores de prostanoides (ver apartado 3.3). Sin embargo, no debe asumirse que, por ejemplo, la 8-*iso* PGF_{2α} actúe a través de receptores FP o que la 8-*iso* PGE₂ lo haga a través de receptores EP. De hecho, se ha comprobado que la mayor parte de los efectos vasoconstrictores de 8-*iso* PGF_{2α} y de 8-*iso* PGE₂ así como la de otros isoprostanos con anillos F y E, fueron sensibles a antagonistas del receptor TP, como ICI 192605 (*Janssen y cols., 2000; Janssen y cols., 2001; Jourdan y cols., 1997; Kawikova y cols., 1996*), L-657925 (*Wagner y cols., 1997*), SQ-29548 (*Banerjee y cols., 1992; Elmhurst y cols., 1997; Fukunaga y cols., 1993; John y cols., 1997; Kang y cols., 1993; Kromer y cols., 1996; 1998; 1999; Marley y cols., 1997; Mohler y cols., 1996; Sametz y cols., 2000; Wagner y cols., 1997*), L-670596 (*Elmhurst y cols., 1997; Lahaie y cols., 1998; Wagner y cols., 1997*), GR-32191 (*Elmhurst y cols., 1997; Oliveira y cols., 2000*), BAY U 3405 (*Okazawa y cols., 1997*), LCB-2853 (*Michoud y cols., 1998*), BMS-180291 (*Mohler y cols., 1996; Zhang y cols., 1996*), BM-13505 (*Kromer y cols., 1996*). Por tanto, la participación de este receptor en la vasoconstricción mediada por isoprostanos está sostenida por una abundante evidencia experimental. De hecho, Audoly y cols. (2000) demostraron que la administración endovenosa de 8-*iso* PGF_{2α} o 8-*iso* PGE₂ no tenía efectos vasculares en el ratón deficiente en receptores TP mientras que inducía un aumento importante de la tensión arterial en ratones control y mucho mayor en ratones transgénicos con sobreexpresión de la isoforma β del receptor TP.

Por otra parte, otros autores han aportado algunas evidencias de que los isoprostanos puedan activar otros receptores de prostanoides, incluyendo los EP y los FP (*Janssen y Tazzeo 2002; Elmhurst y cols., 1997; Sametz y cols., 2000; Ungrin y cols., 2001; Kunapuli y cols., 1997*) e incluso se ha postulado la existencia de un receptor propio de los isoprostanos. Por ejemplo, en el caso de la 8-*iso* PGF_{2α}, se ha visto que ésta posee un efecto dual (*Jourdan y cols., 1997*) en el músculo liso arterial pulmonar de la rata adulta, desarrollando tanto contracción como relajación. Se han encontrado datos que demuestran la presencia de receptores de baja y alta afinidad para los isoprostanos, tanto

en células musculares lisas como en endotelio vascular (*Fukunaga y cols., 1992; Fukunaga y cols., 1997; Yura y cols., 1999*). Estos receptores de alta afinidad son los que se han propuesto como receptores específicos de isoprostanos. Sin embargo, su completa caracterización no ha sido llevada a cabo hasta el momento.

4.6.5 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil a isoprostanos

Son tres los mecanismos que se han postulado para explicar la transducción de la señal intracelular de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos a nivel del músculo liso vascular (*Janssen y cols., 2001*).

1.- Como hemos comentado previamente, los efectos contráctiles de muchos isoprostanos parecen mediados por el receptor TP. Este receptor, como otros ligados a la proteína G, está acoplado a la fosfolipasa C. La fosfolipasa C activada cataliza la hidrólisis del fosfoinositol difosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ aumenta la [Ca²⁺]_i, al facilitar su liberación desde los depósitos intracelulares y aumentar su entrada a través de los canales tipo L de la membrana celular. El DAG activa la cinasa de la proteína C (PKC), aumentando la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺ (*Berkenbosch y cols., 2001*). Algunos estudios realizados en vasos de rata describen como la 8-*iso* PGF_{2α} activa la fosfolipasa C y produce elevación de niveles citosólicos de IP₃ (*Fukunaga y cols., 1993a; 1993b*). Las contracciones mediadas por 8-*iso* PGF_{2α} fueron, en estos estudios, sensibles al inhibidor de la proteína kinasa C calfofina C pero también a bloqueantes de canales de calcio tipo L (*Wagner y cols., 1997*).

2.- Otros estudios demuestran que los isoprostanos no alteran la concentración intracelular de calcio (*Fukunaga y cols., 1997; Hou y cols., 2000; Janssen y cols., 2001*), sino que producen contracción mediante un incremento de la sensibilidad al calcio del aparato contráctil. Así, la contracción mediada por la 8-*iso* PGE₂ en arterias pulmonares humanas, no resultó afectada al bloquear el flujo de calcio mediante nifedipina o al vaciar los depósitos internos de calcio mediante ácido ciclopiazónico (*Janssen y cols., 2001*). Es más, la medición directa de flujos de calcio en células musculares lisas vasculares pulmonares humanas no demostró incremento del calcio

intracelular $[Ca^{2+}]_i$ durante la contracción mediada por 8-iso PGE₂ y 8-iso PGF_{2α} (Janssen y cols., 2001). Este fenómeno de sensibilización al calcio, parece que implica la activación de la Rho y Rho cinasa, las cuales se encargan de fosforilar y por lo tanto suprimir la actividad de la fosfatasa de cadena ligera de la miosina (MLCP) (Somlyo y cols., 2000). De hecho, Janssen y cols. (2001) demostraron que la contracción mediada por 8-iso PGE₂ en arterias y venas pulmonares humanas no resultó afectada por dos antagonistas diferentes de la PKC, con diferentes mecanismos de acción: queleritrina y calfoestina C, las cuales interactúan con la PKC en sus sitios regulador y catalítico respectivamente. De igual forma resultaron insensibles a la acción de antagonistas de ERK₁/ERK₂ (PD-98059) o de p38 cinasa (SB-203580), pero la contracción se redujo en presencia de dos antagonistas de Rho cinasa (Y-27632 y HA-1077) y de un antagonista de la tirosina cinasa (genisteína) (Janssen y cols., 2001). (**Figura 7**).

3.-Por último y al contrario de lo expuesto en los dos puntos anteriores, hay datos de experimentos realizados en retina de cerdos (Lahaie y cols., 1998) y en microvasos periventriculares (Hou y cols., 2000) cerebrales que sugieren que los isoprostanos pueden activar el músculo liso indirectamente a través del endotelio. Esto se produciría mediante la liberación de endotelina o TXA₂ a nivel endotelial. En ese sentido, Belik y cols (2003) demostraron que la 8-iso PGF_{2α} produjo un marcado incremento en la producción de TXA₂ (determinada mediante la medición de su metabolito estable TXB₂) en el pulmón de rata de 1 semana. De modo muy interesante, este efecto de la 8-iso PGF_{2α} no fue observado en el pulmón de rata adulta. Esto sugiere que los mecanismos de transducción de la respuesta contráctil mediada por los isoprostanos pudieran ser diversos y sufrir una evolución ontogénica.

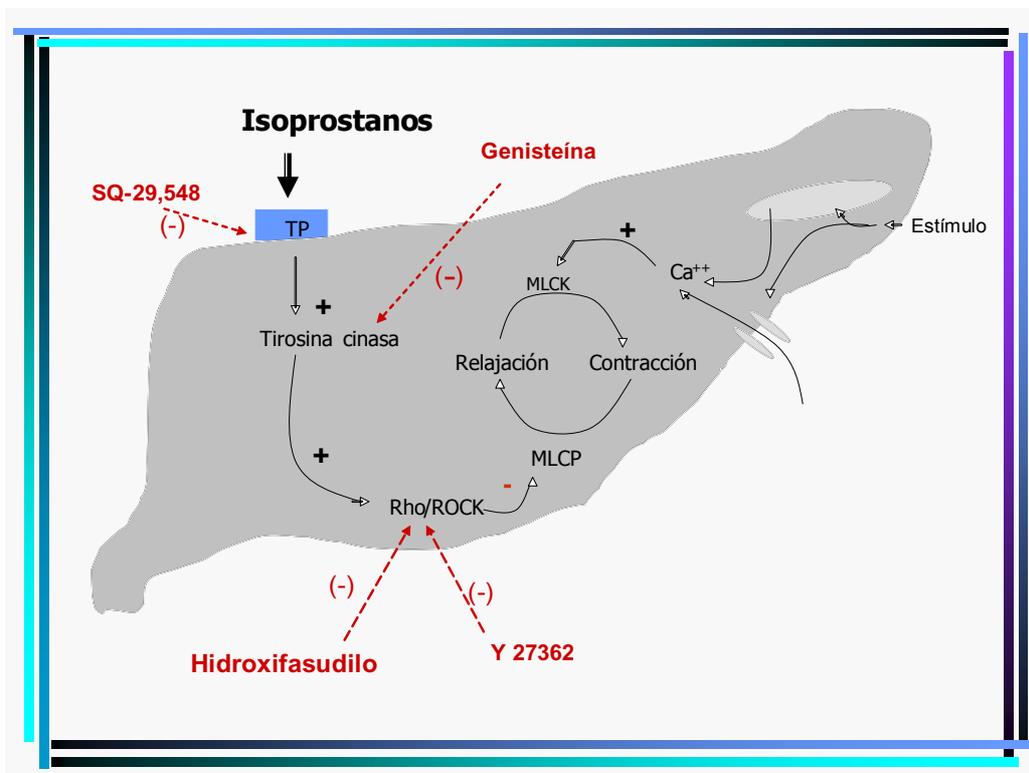


Figura 7. Esquema propuesto de transducción de la señal intracelular mediada por los isoprostanos.

4.6.6 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante mediada por isoprostanos

Como ya hemos comentado previamente, muchos vasodilatadores actúan indirectamente a través de la liberación endotelial de PGs, NO y/o uno o más factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHF). La naturaleza exacta de los EDHF, ha sido debatida durante décadas y es un problema todavía no resuelto. Los EDHF han sido asociados con especies reactivas de oxígeno, potasio, etc. Algunos grupos de investigadores sostienen la hipótesis de que al menos algunos de los EDHFs son isoprostanos. Esta hipótesis se basa en:

- 1- La idea de que los EDHFs serían metabolitos del ácido araquidónico, cuya generación es independiente de COX, características ambas propias de los isoprostanos (*Janssen y cols., 2002*).
- 2- Los isoprostanos se liberan desde el endotelio (*Watkins y cols., 1999; Janssen y cols., 2001*). En general se cree que esto ocurre exclusivamente ante situaciones de daño endotelial.
- 3- Los radicales libres y las especies reactivas al oxígeno juegan un papel primordial en la producción de isoprostanos y parecen hacerlo también en la formación de algunos EDHFs.
- 4- La PLA₂ desarrolla una acción clave en la producción y liberación de isoprostanos (*Rokach y cols., 1997; Morrow y cols., 1992*). En este sentido, se ha visto que los efectos mediados por los EDHFs son sensibles a los inhibidores de PLA₂ (*Hecker y cols., 1994; Hayabuchi y cols., 1998; Hutcheson y cols., 1999; Bauersach y cols., 1994; Adeagbo y cols., 1998; Vanheel y cols., 1999; Barlow y cols., 2000*).
- 5- Los isoprostanos y los EDHFs son potentes agentes vasoactivos que evocan sus efectos de una manera dependiente de compuesto, tejido y especie.

En resumen, muchas de las propiedades de las EDHFs son comunes a los isoprostanos, sin embargo se precisa la aportación de más trabajos para poder decir que hablamos de las mismas moléculas. Por otra parte, los trabajos de Belik y cols (2003) en arterias pulmonares de rata, demuestran que la relajación mediada por la 8-*iso* PGF_{2α} fue endotelio dependiente y abolida por la inhibición de la óxido nítrico sintetasa. La inhibición de la COX, redujo pero no eliminó esta relajación. Estos datos sugieren una participación de la vía NO-GMPc y de la vía COX en la relajación mediada por isoprostanos. De manera llamativa, estos efectos relajantes de la 8-*iso* PGF_{2α} fueron observados solamente en la rata adulta, pero no en las ratas de 1 a 2 semanas.

Hipótesis/Objetivos

B. HIPÓTESIS / OBJETIVOS

A lo largo de la vida fetal y neonatal, la respuesta a los estímulos vasoactivos varía dependiendo probablemente del estado de desarrollo estructural de la circulación pulmonar y quizás más específicamente de la evolución estructural y funcional de determinados receptores. En los últimos años han sido numerosos los estudios que se han centrado en los cambios producidos con la edad en la reactividad vascular pulmonar en varias especies de mamíferos, comparando los vasos pulmonares en los períodos fetal, neonatal y adulto. Se han descrito diferencias madurativas tanto en la vasoconstricción como en la relajación dependiente e independiente del endotelio en el cordero (*Dunn y cols., 1989; Abman y cols., 1990; 1991; Toga y cols., 1991; Kolber y cols., 2000*), cerdo (*Levy y cols., 1995; Boels y cols., 1999; 2001; Villamor y cols., 2000*), conejo (*Docherty y MacLean, 1998a; 1998b; Morecroft y MacLean, 1998*) y cobayo (*Thompson y Weiner, 1993; Belik, 1994*) entre otros. El objetivo de estos estudios era alcanzar una mejor comprensión de: (1) la peculiar situación hemodinámica de la circulación pulmonar fetal (2) los mecanismos que regulan la transición de la circulación pulmonar que ocurre al nacer y (3) las diferencias existentes en el control del tono vascular pulmonar entre el período neonatal y el adulto.

Son muchas las investigaciones destinadas a estudiar en profundidad los cambios que durante el período neonatal tienen algunos mediadores vasoactivos como el NO (*Abman y cols., 1990; 1991; Shaul y cols., 1993; Steinhorn y cols., 1993; Villamor y cols., 1997; 2000; Kolber y cols., 2000*), los eicosanoides (*Abman y Stenmark 1992; Shaul y cols., 1993b; Ibe y cols., 1997*), la ET-1 (*Toga y cols., 1991; Docherty y MacLean, 1998*), el péptido natriurético atrial (*Perreault y cols., 1997b; Matsushita y cols., 1999*), los canales de K⁺ (*Reeve y cols., 1998*), las purinas (*McMillan y cols., 1999*), la respuesta miogénica (*Belik, 1994*), el monóxido de carbono (*Villamor y cols., 2000, Grover y cols., 2000*), la 5-hidrotriptamina (*Morecroft y MacLean 1998a*) la bradiquinina (*Boels y cols., 1999*), las PDEs (*Okogbule-Wonodi y cols., 1998; Moreno y cols., 2004*), la GCs (*Moreno y cols., 2005*), la adrenomedulina (*Marinoni y cols., 1999, Takahashi y cols., 1999*) el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Hislop y cols., 1998*), el factor

activador plaquetario (*Ibe y cols., 1998*), el polipéptido vasoactivo intestinal (*Hislop y cols., 1998*), la PKC (*Berkenbosch y cols., 2001*) y las fosfatasas (*Berkenbosch y cols., 2001*). Sin embargo, a pesar de la relevancia de estas investigaciones, queda aún por evaluar el papel de muchos factores vasoactivos en lo que concierne a sus efectos en la circulación pulmonar neonatal.

Durante los últimos años, la hipótesis de que los isoprostanos no son sólo marcadores de peroxidación lipídica sino que desempeñan una actividad biológica ha sido apoyada por numerosa evidencia experimental (*Cracowski y cols., 2002; Fukunaga y cols., 1993; Hoffman y cols., 1997; Jourdan y cols., 1997; Janssen y cols., 2001; Oliveira y cols., 2000; Zhang y cols., 2003; Janssen y Tazzeo, 2002; Tazzeo y cols., 2003*). A nivel vascular, se han descrito acciones mediadas por los isoprostanos que abarcan desde la potente vasoconstricción a la completa relajación de las células musculares lisas vasculares (*Jourdan y cols., 1997; Janssen y cols., 2001*). Estos efectos van a variar dependiendo del isoprostano estudiado, de la especie animal, de la edad y del tipo de vaso (*Belik y cols., 2003; Janssen y cols., 2001*). El período neonatal se presenta como un momento de la vida particularmente interesante para la producción y eventualmente la acción de los isoprostanos. En el momento del nacimiento se produce un marcado aumento en la saturación arterial de oxígeno, con el consiguiente incremento del estrés oxidativo. Por otra parte, como hemos señalado previamente, en los últimos años se han acumulado evidencias de que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en diversas enfermedades neonatales (*Ahola y cols., 2004; Saugstad y cols., 2001*). A pesar de ello, la información existente sobre la acción vascular de los isoprostanos en el período neonatal es muy limitada.

Nuestras **HIPÓTESIS** en la presente Tesis Doctoral han sido:

- 1.- Los isoprostanos ejercen efectos vasculares en los vasos neonatales.

- 2.- Los efectos vasculares de los isoprostanos experimentan cambios durante los primeros días de vida postnatal.

Nuestros **OBJETIVOS** han sido:

1. Estudiar los efectos contráctiles de los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₁, *8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{1α}, *8-iso* PGF_{1β}, *8-iso* PGF_{2α} y *8-iso* PGF_{2β}) sobre arterias pulmonares, venas pulmonares y arterias mesentéricas de lechones recién nacidos (12-24 h de vida) y lechones de 2 semanas.

1.2 Determinar la eficacia y potencia de dichos isoprostanos.

1.3 Comparar la eficacia y potencia de dichos isoprostanos con el U46619.

2. Valorar los cambios ontogénicos en relación a los efectos contráctiles de los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₁, *8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{1α}, *8-iso* PGF_{1β}, *8-iso* PGF_{2α} y *8-iso* PGF_{2β}) entre lechones recién nacidos y lechones de 2 semanas sobre arterias pulmonares, venas pulmonares y arterias mesentéricas.

3. Dilucidar los mecanismos de transducción de la respuesta contráctil de los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{2α} y *8-iso* PGF_{2β}) en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas.

4. Estudiar los efectos relajantes de los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₁, *8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{2α}) sobre arterias pulmonares, venas pulmonares, arterias mesentéricas y arterias coronarias de lechones de 2 semanas.

5. Valorar los cambios ontogénicos en relación a los efectos relajantes de los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₁, *8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{2α}) sobre arterias pulmonares, venas pulmonares y arterias mesentéricas de lechones de 2 semanas.

6. Dilucidar los mecanismos de transducción de la respuestas relajante de *8-iso* PGE₂ en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas.

Animales de Experimentación, Material y Métodos

C. ANIMALES EXPERIMENTACIÓN. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación
2. Obtención de los tejidos
3. Registro de la contractilidad vascular
 - 3.1 Contracción
 - 3.2 Relajación
4. Protocolos experimentales
 - 4.1 Contracción
 - 4.1.1 Estudio de la contracción vascular inducida por isoprostanos.
 - 4.1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos.
 - 4.1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos.
 - 4.2 Relajación
 - 4.2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos.
 - 4.2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos.

1 Animales de experimentación

Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo de acuerdo con el Acta Europea de 1986 sobre procedimientos científicos con animales de experimentación y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Maastricht.

Los experimentos se han realizado en lechones de raza híbrida Landrace-Largewhite de 12 a 24 horas y de 2 semanas -entre 15 y 18 días de edad- (*Tabla 8*).

	Número total	Peso (media±eem)	Porcentaje: Machos/Hembras
RN	24	1155,12±127,87	11/13
2 semanas	50	3270,45±157,36	24/26

Tabla 8. Peso y género de los lechones estudiados según edad.

El motivo de la elección de esta especie animal viene determinado porque su anatomía cardiorrespiratoria y la adaptación de la circulación pulmonar a la vida extrauterina son muy similares a la humana. Existen múltiples analogías entre la especie humana y el cerdo en cuanto a los mecanismos de adaptación pulmonar: en el paso de la circulación fetal a la de tipo adulto, en los factores fisiopatológicos que derivan en la situación de HPPN y en el tipo de respuesta a las medidas terapéuticas empleadas. A lo largo de los tres primeros meses de vida resultan equiparables los cambios sufridos en el desarrollo pulmonar a nivel vascular y alveolar entre ambas especies, aunque existen pequeñas diferencias a nivel estructural, funcional y temporal (*Haworth y Hislop, 1981; Moreno y cols., 2005*). Por estos motivos, el cerdo ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la fisiología, fisiopatología y farmacología vascular pulmonar neonatal (*Drummond y cols., 1978; Haworth y Hislop, 1981; Pérez-Vizcaíno y cols., 1996; 1996b; 1996c; 1997; 2001; Villamor y cols., 1996; 1996b; 1997*).

2 Obtención de los tejidos

Los animales se obtuvieron de una granja local y se sacrificaron con edades entre 12-24 horas y 2 semanas (15-18 días) de vida. Esto se llevó a cabo por exanguinación después de ser anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbitona sódica (100 mg/kg). Tras el sacrificio se comprobó mediante la visualización del contenido gástrico e intestinal, que todos los animales en el primer día de vida habían recibido alimento. Es importante remarcar esta observación porque se ha observado que la primera toma induce cambios significativos en el control del tono vascular mesentérico del lechón (*Reber y cols., 2002*).

Tras el sacrificio de los animales, los bloques cardiopulmonar e intestinal fueron extraídos y sumergidos rápidamente en una solución de Krebs-Ringer a 4°C (composición en mmol L⁻¹: NaCl, 118.5; KCl, 4.75; MgSO₄ • 7H₂O, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25.0; CaCl₂, 2.5; glucosa, 5.5) para su transporte inmediato al laboratorio. El tiempo transcurrido entre el sacrificio y el inicio de la disección de los tejidos en el laboratorio fue aproximadamente de una hora. La disección y extracción de los vasos se llevó a cabo bajo un microscopio binocular. Durante todo el proceso de disección, los tejidos permanecieron bañados en solución de Krebs-Ringer a 4°C. Sobre una placa de Petri, se procedió a la extracción de las arterias y venas pulmonares de tercer-cuarto orden. Los anillos de las arterias mesentéricas se obtuvieron de la mitad distal del tronco de ésta (*Reber y Nowicki, 1998*) y los anillos de las arterias coronarias de la descendente anterior izquierda. Los vasos disecados se seccionaron transversalmente, obteniendo anillos de 2 a 3 mm de longitud. En algunos experimentos, se eliminó el endotelio de los vasos a través de la introducción en la íntima de los anillos de una varilla de metal sobre la que fue rotado dicho vaso (*Villamor y cols., 1996; 1996b; 1997*).

3 Registro de la contractilidad vascular

A través de cada anillo arterial se hicieron pasar dos alambres de acero (0.2 mm de diámetro). Uno de ellos quedaba fijo a un sistema de sujeción y el otro se conectó a un transductor isométrico fuerza-desplazamiento (modelo PRE 206-4, Cibertec, Madrid). La señal de fuerza isométrica fue amplificada, convertida de analógica a digital utilizando un sistema PowerLab (AD-Instruments, Castle Hill, Australia) y registrada en un ordenador mediante el software Chart v3.4 (AD-Instruments, Castle Hill, Australia). Los anillos se colocaron horizontalmente en copas de Allhin de 5 mL de capacidad que contenían solución de Krebs burbujeada de forma constante con 95% O₂ y 5% CO₂. Las preparaciones se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C, por medio de la circulación continua de agua a través del sistema de doble pared de las copas de Allhin.

Los anillos fueron sometidos a la tensión basal a la que por experimentos previos en estos vasos, se comprobó una mayor respuesta contráctil a 62,5 mM de KCl (**Tabla 9**). Las preparaciones se dejaron estabilizar durante un período de 90 minutos. Durante este tiempo se realizaron cambios repetidos de la solución nutritiva a intervalos de 30 minutos y reajustes de la tensión basal (*Pérez- Vizcaino y cols., 1991; 1993*). Tras este período de estabilización se llevó a cabo una contracción con 62,5 mM de KCl con el fin de evaluar el estado funcional del vaso y establecer una contracción de referencia no mediada por receptor que fue usada para normalizar las respuestas a isoprostanos (ver análisis estadístico de los resultados). Cuando la contracción inducida por 62,5 mM de KCl fue estable, se añadió ACh a una concentración de 10⁻⁷ M para evaluar el estado funcional del endotelio (**Figura 8**). Tras lavar repetidamente el vaso y permitir el retorno a la tensión basal, se inició el protocolo correspondiente.

Tabla 9. Tensión basal a la que fueron sometidos los distintos anillos vasculares al principio del experimento.

Vaso	RN	2 semanas
Arteria pulmonar	300 mg	500 mg
Vena pulmonar	500 mg	500 mg
Arteria mesentérica	1000 mg	2000 mg
Arteria coronaria	1000 mg	1000 mg

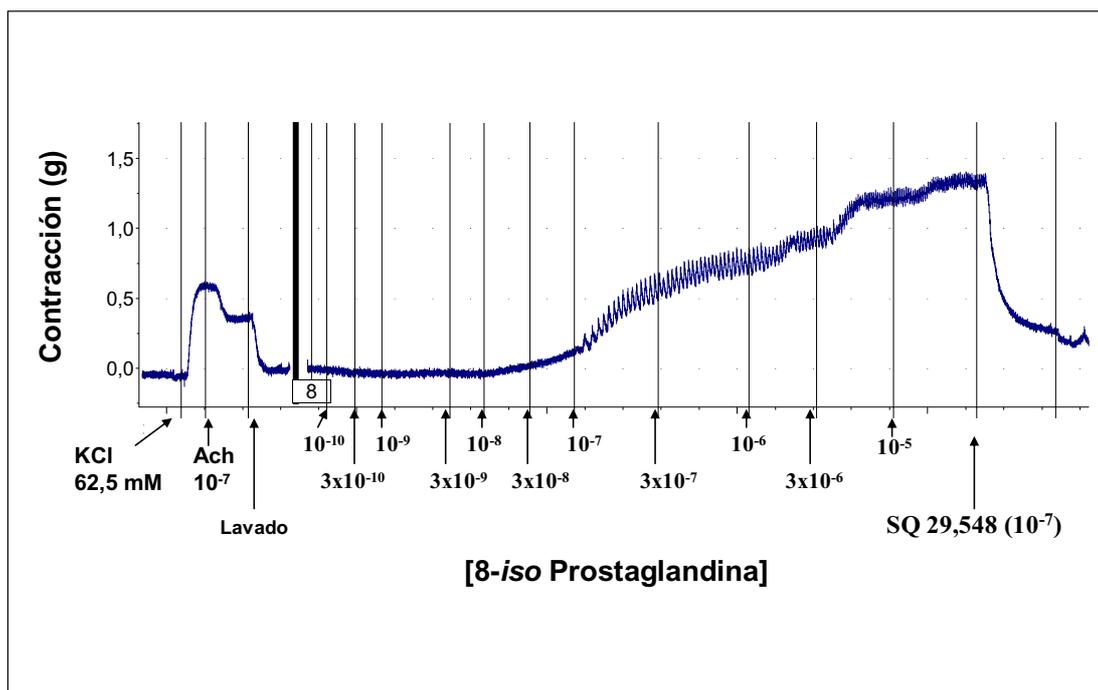


Figura 8 Registro original de un experimento típico de contracción. Tras un periodo de estabilización inicial de 90 min –en el que se han realizado lavados con solución de Krebs burbujeada cada 30 min–, el vaso es contraído con 62,5mM de KCl. Una vez alcanzado el efecto máximo, se añade Ach (10^{-7} M), con lo que se comprueba la función endotelial. Se lava repetidamente el vaso con solución de Krebs hasta que retorna a la tensión basal. A continuación procedemos a la administración del fármaco en estudio –en este caso una 8-iso prostaglandina- incrementando de forma acumulativa la concentración del mismo en la solución nutritiva. La concentración mínima es de 10^{-10} M y la máxima de 10^{-5} M. Antes de añadir una nueva dosis se espera a la estabilización de la contracción que se ha desencadenado con la dosis previa. Cada una de las respuestas obtenidas con las diferentes concentraciones del fármaco en la solución nutritiva, se expresa en función de la contracción máxima lograda con la administración de KCl al inicio del experimento. En algunos experimentos, como el que muestra la figura, se añadió el antagonista del receptor TP –SQ 29,548 (10^{-7} M)– al alcanzar la contracción máxima, con lo que se obtiene una relajación que puede ser cuantificada.

3.1 Contracción

Los agonistas contráctiles se evalúan bajo el tono basal (**Tabla 9**). Se construyeron curvas concentración-respuesta incrementando de forma acumulativa la concentración del agonista a estudiar en la solución nutritiva. Cada nueva dosis se añadió una vez que la anterior había producido una respuesta contráctil estable (*Villamor y cols., 1996; 1996b; 1997*) (**Figura 8**)

3.2 Relajación

Para estudiar los posibles efectos relajantes de los isoprostanos o de los otros agonistas utilizados, se llevó a cabo inicialmente una contracción de los vasos. En la mayor parte de los experimentos, se utilizó U46619 -mimético del TXA₂ - o endotelina-1 como agente contráctil. Una vez alcanzada una contracción estable, se construyó una curva dosis-respuesta al agonista relajante (**Figura 9**).

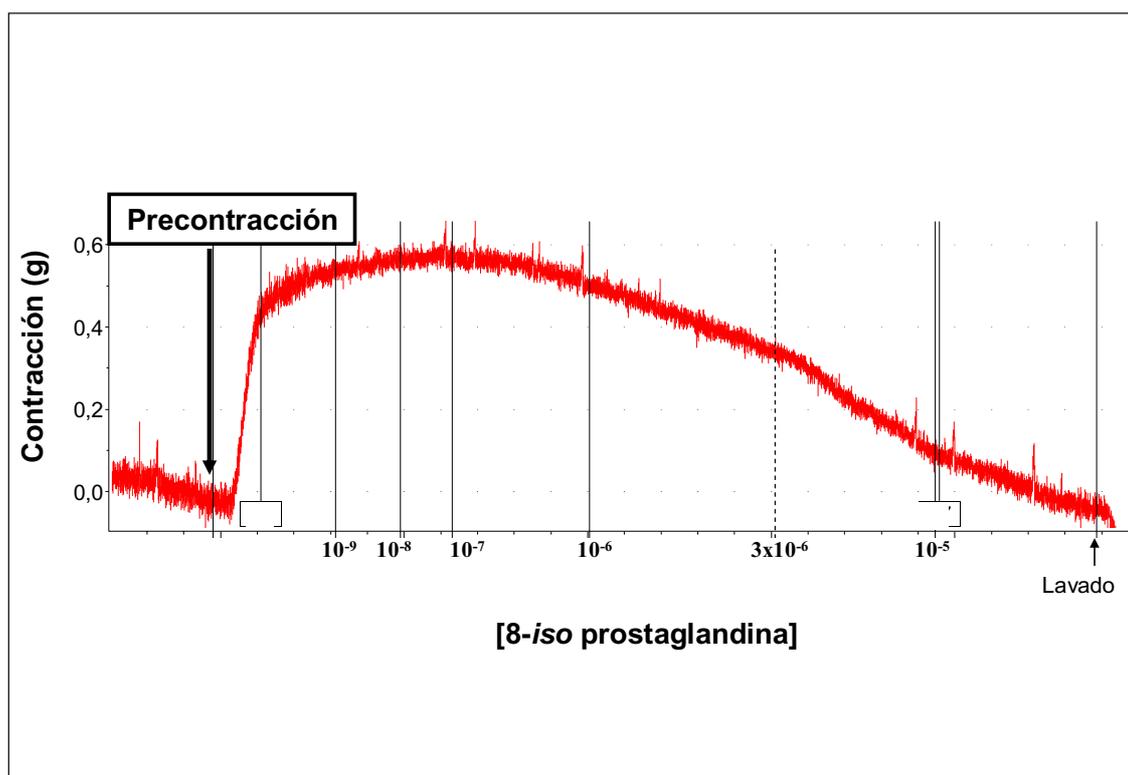


Figura 9 Registro original de un experimento típico de relajación. Se ha obviado la contracción inicial con 62,5mM de KCl, que es común a todos los registros y tras la cual se lava repetidamente el vaso con solución de Krebs hasta que sea posible aplicar la tensión basal. Inicialmente se lleva a cabo una contracción de los vasos con U46619 -mimético del TXA₂ - o ET-1. Una vez alcanzada una contracción estable, procedemos a la administración del fármaco en estudio –en este caso una 8-iso prostaglandina- incrementando de forma acumulativa la concentración del mismo en la solución nutricia. La concentración mínima es de 10⁻¹⁰M y la máxima de 10⁻⁵M. Antes de añadir una nueva dosis se espera a la estabilización de la relajación que se ha desencadenado con la dosis previa. Cada una de las respuestas obtenidas con las diferentes concentraciones del fármaco se expresa como el porcentaje de reducción de la contracción previa inducida por U46619 o ET-1.

4. Protocolos experimentales

4.1 Contracción

4.1.1 Estudio de la contracción vascular inducida por isoprostanos.

Se estudiaron los siguientes isoprostanos:

- Con anillo E: 8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGE₂.
- Con anillo F: 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β}, 8-*iso* PGF_{2α} y 8-*iso* PGF_{2β}.

Se compararon los efectos de los isoprostanos con los del U46619. Al disponer de ocho cámaras de órganos, en cada una de ellas se estudió la respuesta a uno de los seis isoprostanos en un anillo vascular del mismo animal. En las otras dos se estudiaron la respuesta al U46619 y al solvente (DMSO). Por tanto, sólo un anillo por territorio vascular y animal fue utilizado en el mismo protocolo.

4.1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos

Para evaluarla, se utilizó el antagonista de este receptor SQ 29,548 en dos tipos distintos de protocolos. En el primero de ellos, los vasos fueron incubados durante 15 minutos con el SQ 29,548 a concentraciones de 10⁻⁸ M y se llevó a cabo la curva de concentración respuesta al isoprostano o al U46619. En otros experimentos, se añadió SQ 29,548 10⁻⁷ M al final de la curva concentración respuesta al isoprostano o al U46619 y se evaluó la reversión de la respuesta contráctil llevada a cabo por el antagonista del receptor TP (**Figura 8**).

4.1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos

En estos protocolos, se evaluó la respuesta a isoprostanos y a U46619 en presencia de antagonistas de las diversas vías de señalización de esta respuesta, que han sido propuestas por investigaciones previas de otros autores. En concreto, se utilizaron: queleritrina, genisteína, Y27632, hidroxifasudilo, PD 98059 y SB 203580. Este grupo de experimentos se llevó a cabo en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas y se estudiaron tres de los isoprostanos (8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{2α} y 8-*iso* PGF_{2β}) y el U46619. En la tabla (**Tabla 10**) se resumen las herramientas farmacológicas utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

4.1.4 Papel del endotelio y de la vía de la COX en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos

Este grupo de experimentos se llevó a cabo igualmente en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas y se estudiaron tres de los isoprostanos (8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{2α} y 8-*iso* PGF_{2β}) y el U46619. Se realizaron las curvas de concentración-respuesta en presencia de indometacina y tras eliminación del endotelio.

4.2 Relajación

4.2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos

Se estudiaron los posibles efectos relajantes de los seis isoprostanos previamente mencionados. Los vasos fueron contraídos con U46619 (10⁻⁷ M), ET-1 (10⁻⁵ M) o ET-1(10⁻⁵ M) más SQ 29,548 (10⁻⁸ M) . Los isoprostanos fueron comparados con diversos prostanoides conocidos como agonistas de los receptores EP (misoprostol, PGE₁, PGE₂), DP (PGD₂) e IP (Iloprost) Ver **Tabla 10**.

4.2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos

En estos protocolos, se evaluó la respuesta relajante mediada por isoprostanos en presencia de antagonistas de las diversas vías de señalización, que han sido propuestas por investigaciones previas de otros autores. En concreto, se utilizaron ODQ, L-NAME e indometacina. (**Tabla 10**). Dado que algunos de estos compuestos producen cambios en la contracción mediada por U46619 o ET-1 (en general aumentándola), en los experimentos en los que se involucraron estos antagonistas, la contracción fue dosificada añadiendo concentraciones acumulativas del agonista contráctil hasta que se superó la respuesta inducida por KCl 62,5 mM en cada vaso individual al comienzo del experimento.

5. Fármacos y soluciones empleadas

Se ha utilizado una solución nutricia el Krebs normal, cuya composición se muestra a continuación:

Componente	NaCl	KCl	NaHCO ₃	MgSO ₄	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	glucosa
mM	118,5	4,75	25	1,2	2	1,2	5,5

Se han usado los siguientes fármacos (**Tabla 10**):

Tabla 10. Descripción de las herramientas farmacológicas utilizadas en esta Tesis Doctoral en la que se incluye código y nombre del fármaco, acción, rango de dosis administrado, solvente utilizado, fuente suministradora y relación de referencias.

Nombre/ Código	Nombre Completo	Acción	Dosis	Solvente	Suminist	Ref.
Isoprostanos con anillo E	8-iso-PGE ₁ , 8-iso-PGE ₂	Agonistas receptor TP (ζ)	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁵ M	DMSO	Cayman Chemical	Roberts y Morrow, 1997
Isoprostanos con anillo F	8-iso-PGF _{1α} , 8-iso- PGF _{1β} , 8-iso-PGF _{2α} y 8-iso-PGF _{2β} .	Agonistas receptor TP (ζ)	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁵ M	DMSO	Cayman Chemical	Roberts y Morrow, 1997
ACh	Acetilcolina	Agonista muscarínico. Estimulante de la NOSe.	10 ⁻⁷ M	Agua destilada y desionizada	Sigma Chemical Co	Furchgott y Zawadzki, 1980
U46619	9,11dideoxi-11 α ,9 α - epoximetano- prostaglandina F2 α	Mimético del TXA2	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁵ M (curvas de contracción)	Agua destilada y desionizada	Sigma Chemical Co	Devillier, 1997
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metiléster	Inhibidor de la NOS.	10 ⁻⁴ M	Agua destilada y desionizada	Sigma Chemical Co	Rees y cols., 1990
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol [4,3-a]quinoxalin-1- ona	Inhibidor de la GCs	10 ⁻⁵ M	DMSO	Sigma Chemical Co	Janssen y cols., 2001
SQ 29,548	((1S-(1 α ,2 β -(5Z)- 3 β ,4 α))-7-[3-[[2- [(phenylamino) carbonyl]hydrazino] methyl]-7-oxabicyclo [2.2.1]Pet-2-yl]-5- heptenoic acid	Antagonista receptor TP	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁷ M	Agua destilada y desionizada	Sigma Chemical Co	Darius y cols., 1985
ET-1	Endotelina-1		10 ⁻⁷ M	Agua destilada y desionizada	Sigma Chemical Co	Masaki y cols., 1989
Quelitrina		Inhibidor de la cinasa de la proteína C	10 μ M	DMSO	Sigma Chemical Co	Herbert y cols., 1990
Genisteína		Inhibidor de la tirosín cinasa	0,1 mM	DMSO	Sigma Chemical Co	Janssen y cols., 2001
Y 27632	(b)-(R)-trans-4-(1- aminoethyl)-N- (pyridyl) cyclohexanecarboxa mide dihydrochloride	Inhibidor de la Rho cinasa	10 μ M	Etanol	Tocris	Janssen y cols., 2001

Nombre Código	Nombre Completo	Acción	Dosis	Solvente	Suminist	Ref.
Hidroxifasudilo (H-2330 HA-1077)	1- (5-Isoquinolinesulfonyl) homopiperazine, Di-HCl Salt	Inhibidor de la Rho cinasa	10 μ M	Agua destilada y desionizada	Asahi Chemical	Janssen y cols., 2001
PD 98059	2-2(2'-amino-3'-methoxyphenol)-oxanaphthalene-4-one	Inhibidor de la cinasa de proteína activadora mitógeno (MAP)	50 μ M	DMSO	Sigma Chemical Co	Janssen y cols., 2001
SB 203580	4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulphanylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole	Inhibidor de la p38-cinasa	30 μ M	DMSO	Sigma Chemical Co	Janssen y cols., 2001
Misoprostol		Agonistas del receptor EP	10^{-9} - 10^{-5} M	Etanol	Sigma Chemical Co	Nicholson, 1988
PGE1, PGE2	Prostaglandinas E1 y E2	Agonistas del receptor EP	10^{-9} - 10^{-5} M	Etanol	Sigma Chemical Co	Horton, 1965
PGD2	Prostaglandina D2	Agonista del receptor DP	10^{-9} - 10^{-5} M	Etanol	Sigma Chemical Co	Horton, 1965
Iloprost		Agonista del receptor IP	10^{-9} - 10^{-5} M	Etanol	Sigma Chemical Co	Stock, 1991
DMSO	Dimetilsulfóxido	Solvente	$1/10^{-6}$ - $0,1/10^{-2}$ mL	DMSO	Sigma Chemical Co	Martin, 1967
Indometacina		Inhibidor de la COX	10^{-5} M	Etanol	Sigma Chemical Co	Winer, 1966

6. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. La “n” refleja el número de animales. Las respuestas contráctiles se expresan con el valor absoluto (g) o bien el valor normalizado relativo a la contracción por KCl 62,5 mM. Este método de normalización fue escogido porque tiene en cuenta no sólo la cantidad de músculo liso vascular presente sino también la capacidad funcional de los anillos para producir contracción. Las respuestas relajantes se expresan como porcentaje de reducción del tono inducido previamente por el agonista contráctil correspondiente (% de relajación). Las curvas concentración-respuesta (*Figuras 8 y 9*) se ajustaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism versión 2.01. según la ecuación logística que se muestra a

continuación:

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{-k \cdot (\text{Log} C - \text{pD}_2)}}$$

Siendo E el efecto del fármaco; E_{max} el efecto máximo; k una constante que representa la pendiente de la curva; C la concentración del fármaco; pD₂ el logaritmo negativo del EC₅₀ (la concentración del fármaco que provoca un 50% de la contracción). Por tanto, el E_{max} es un índice de la eficacia relativa del agonista y el pD₂ ó EC₅₀ un índice de potencia. Todos y cada uno de estos parámetros son calculados en las curvas concentración-respuesta de cada experimento (**Figura 10**).

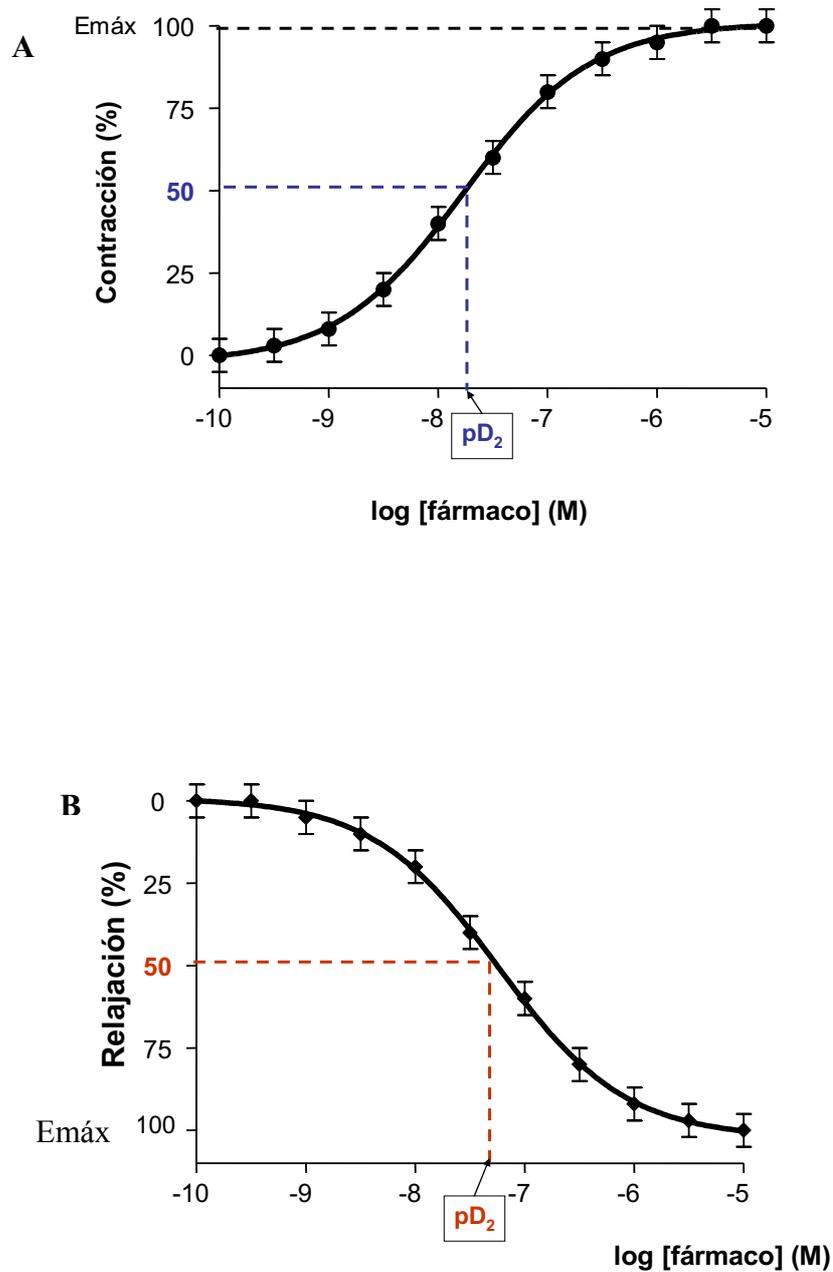


Figura 10. Representación del ajuste de dos curvas concentración-respuesta. El valor de pD_2 corresponde al logaritmo negativo de la concentración del fármaco necesaria para obtener el 50% del efecto máximo (Emax), tanto de contracción (**A**) como de relajación (**B**).

Sin embargo, esta ecuación no pudo aplicarse y por tanto no pudo determinarse el valor del EC50 para la mayoría de los isoprostanos estudiados ya que no se llegó a obtener una respuesta máxima con la concentración más alta que se pudo probar (10^{-5} M). Por esta razón, los datos de estos experimentos no se ajustaron a la ecuación anteriormente referida, sino a una recta calculada por el método de mínimos cuadrados, mediante la utilización del paquete informático Microsoft Excel versión 2003. A partir de este ajuste se obtuvo para las respuestas contráctiles, el EC_{K10} y el EC_{K30} , que definimos como la concentración de isoprostano que produjo una respuesta contráctil equivalente al 10 y al 30%, respectivamente, de la respuesta contráctil inducida por el KCl 62,5 mM al inicio del experimento. Este índice nos permitió comparar la potencia de los distintos isoprostanos, aunque no se hubiera alcanzado el efecto máximo (*Figura 11*). Las comparaciones entre dos medias se llevaron a cabo mediante una t de Student para grupos de datos independientes y las comparaciones entre más de dos medias se llevaron a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls. Se ha considerado como estadísticamente significativo un nivel de aceptación, de la hipótesis nula, inferior al 5% ($P < 0.05$).

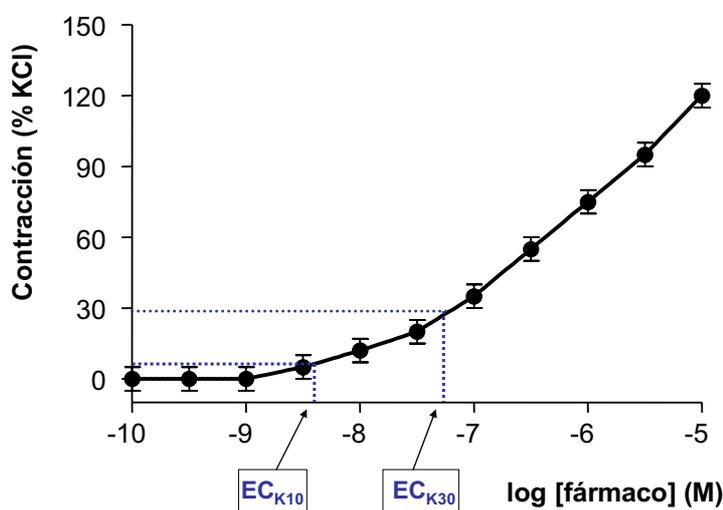


Figura 11. Representación de curvas dosis-respuesta que muestran los logaritmos negativos correspondientes a valores del 10% y 30% de la respuesta contráctil inducida por el KCl al inicio del experimento.

Resultados

D. RESULTADOS

1. Contracción

1.1 Respuesta contráctil a 8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β}, 8-*iso* PGF_{2α}, 8-*iso* PGF_{2β} y U46619 en el lechón recién nacido (12-24 horas) y de 2 semanas de edad.

1.1.1 Arteria pulmonar

1.1.2 Vena pulmonar

1.1.3 Arteria mesentérica

1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos.

1.2.1 Relajación mediada por SQ 29,548 (10⁻⁷M) tras contracción inducida por los isoprostanos y por U46619.

1.2.2 Inhibición de la contracción inducida por los isoprostanos y por U46619 en presencia de SQ 29,548 (10⁻⁸M).

1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos y por U46619.

1.4 Papel del endotelio y de la vía de la COX en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos

2. Relajación

2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos

2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos

Contracción ...

1. Contracción

1.1 Respuesta contráctil a 8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β}, 8-*iso* PGF_{2α}, 8-*iso* PGF_{2β} y U46619 en el lechón recién nacido (12-24 horas) y de 2 semanas de edad.

Los isoprostanos desarrollaron contracciones del orden de 1,5-2 veces mayor que la desencadenada por 62,5 mM de KCl. Sin embargo, mostraron en general una potencia (pD₂) y eficacia (Emáx) más bajas que el agonista del receptor TP, el U46619. (*Figuras 11-34; Tablas 11-17*).

1.1.1 Arteria pulmonar

En las arterias pulmonares, la 8-*iso* PGE₂ fue el isoprostano más potente (pD₂= -6,69±0,07) (*Figura 12 y Tabla 12*). Al realizar las curvas de concentración-respuesta, se observó una respuesta bifásica (contracción con las dosis más bajas y relajación a las concentraciones más altas de 8-*iso* PGE₂), efecto que resultó ser más evidente en los lechones de 2 semanas (*Figura 12*).

La 8-*iso* PGF_{2α} fue el isoprostano con mayor eficacia, es decir aquel que produjo los mayores niveles de contracción en ambos grupos de edad (*Figura 14 y Tabla 14*). Sin embargo no obtuvimos contracciones máximas con la máxima concentración que pudimos probar (10⁻⁵M). El umbral de concentración detectable para el efecto contráctil de 8-*iso* PGF_{2α} fue relativamente alto (3x10⁻⁸ M).

Prácticamente no se obtuvo respuesta contráctil para 8-*iso* PGF_{1α} ni para 8-*iso* PGF_{1β} en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas aunque por el contrario, desarrollaron una contracción potente en la arteria pulmonar del lechón de 12-24 horas (*Figuras 13 y 15; Tablas 13 y 15*).

Las contracciones llevadas a cabo por 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β} y 8-*iso* PGF_{2β} resultaron ser significativamente mayores en el lechón recién nacido que en el de 2 semanas para algunas de las concentraciones (*Figuras 12, 13, 15 y 16; Tablas 12, 13, 15 y 16*). Por otro lado, no se observaron cambios relativos a la edad en las

contracciones de las arterias pulmonares inducidas por 8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGF_{2α} y U46619 (**Figuras 11, 14 y 17; Tablas 11, 14 y 17**).

El producto utilizado como solvente para los isoprostanos (DMSO) no demostró efecto contráctil sobre las arterias pulmonares (**Figura 18**) y la contracción ejercida por KCl 62,5 mM fue significativamente mayor en las arterias pulmonares de lechones de dos semanas (**Figura 18**).

1.1.2 Vena pulmonar

La 8-*iso* PGE₂ fue el isoprostano más potente y eficaz. En términos de eficacia (aunque no de potencia) fue comparable a U46619 en lechones de 12-24 horas (**Figuras 20 y 25 y Tablas 12 y 17**). La eficacia de la 8-*iso* PGF_{2α} en las venas pulmonares del recién nacido fue también equiparable a la de U46619 (**Figuras 20 y 25; Tablas 12 y 17**). Cuando se comparan las contracciones producidas por los isoprostanos en venas pulmonares del lechón de 12-24 horas y el lechón de 2 semanas, no se observa un patrón ontogénico claro. Sin embargo, para algunas concentraciones en particular de 8-*iso* PGE₂ y de 8-*iso* PGF_{1α} las venas pulmonares del recién nacido desencadenaron contracciones superiores (**Figuras 20 y 21**). Al igual que ocurre con las arterias pulmonares, las concentraciones mayores de 8-*iso* PGE₂ ($>3 \times 10^{-6}$ M), reducen el tono en las venas pulmonares, efecto que resultó más marcado en los animales de 2 semanas (**Figura 20**).

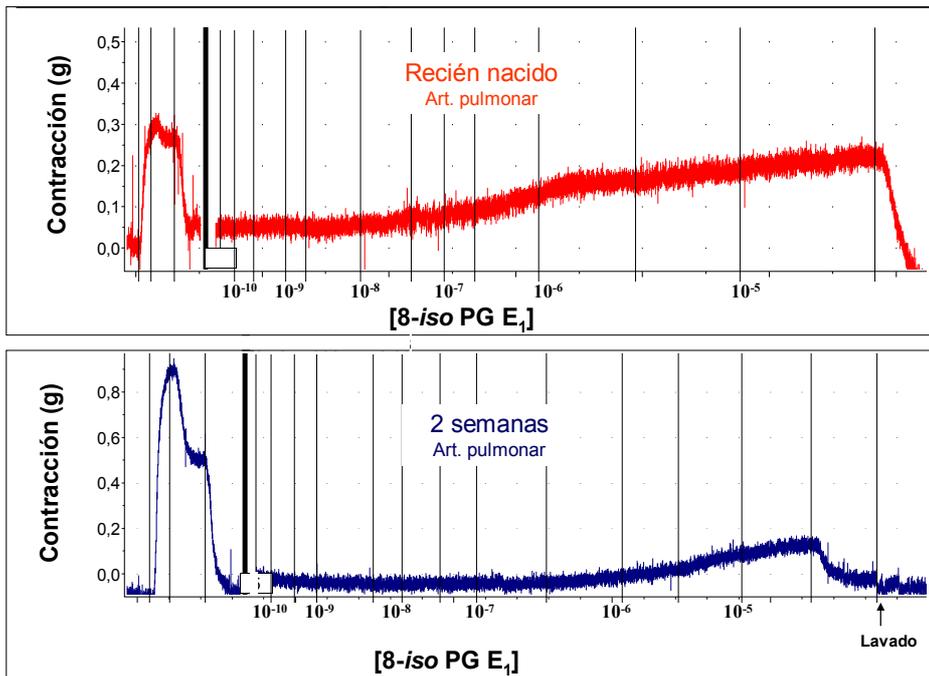
La contracción desencadenada por KCl (62,5 mM) en venas pulmonares fue mayor que la observada en arterias pulmonares. Al igual que lo descrito en arterias, resultó ser significativamente mayor en animales de 2 semanas (**Figura 26**).

1.1.3 Arteria mesentérica

La respuesta de los isoprostanos en arterias mesentéricas fue muy variable. El más potente y eficaz fue la 8-*iso* PGE₂, cuya eficacia (aunque no potencia), puede equipararse al U46619 en animales de 12-24 horas (**Figuras 28 y 33; Tablas 12 y 17**). Pese a que la respuesta contráctil mediada por 8-*iso* PGF_{1α} y de 8-*iso* PGF_{1β} en arterias

mesentéricas de recién nacidos se expresa desde concentraciones muy bajas, el efecto máximo que producen a 10^{-5} M es muy escaso. Es por esto por lo que se explica su elevada potencia y baja eficacia. La relajación inducida por altas dosis de 8-*iso* PGE₂ en arterias pulmonares y venas pulmonares no se observó en las arterias mesentéricas (**Figura 28**). Los siguientes isoprostanos: 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1 α} , 8-*iso* PGF_{2 α} y 8-*iso* PGF_{2 β} produjeron contracciones más altas en las arterias mesentéricas del recién nacido que en los vasos correspondientes de los animales de 2 semanas (**Figuras 28,29,30 y 32; Tablas 12,13,14 y 16**). La sensibilidad del U46619 también disminuyó con la edad postnatal (**Figuras 33; Tabla 17**).

A



B

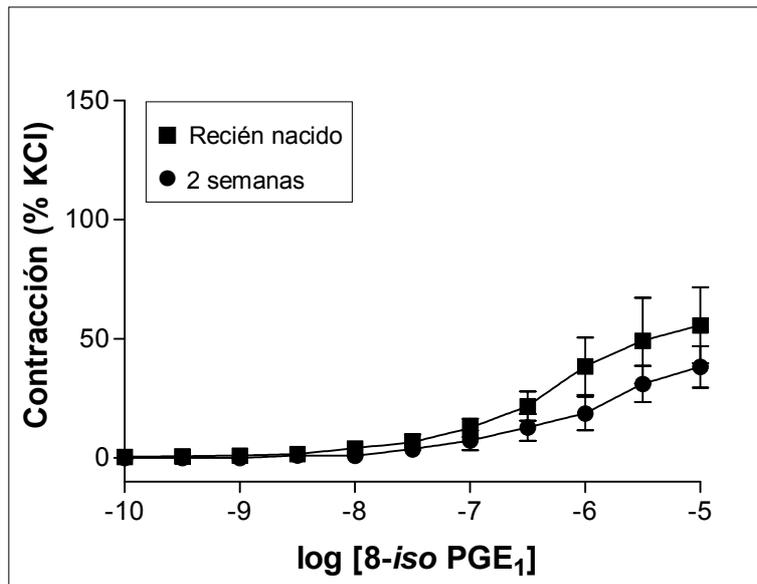
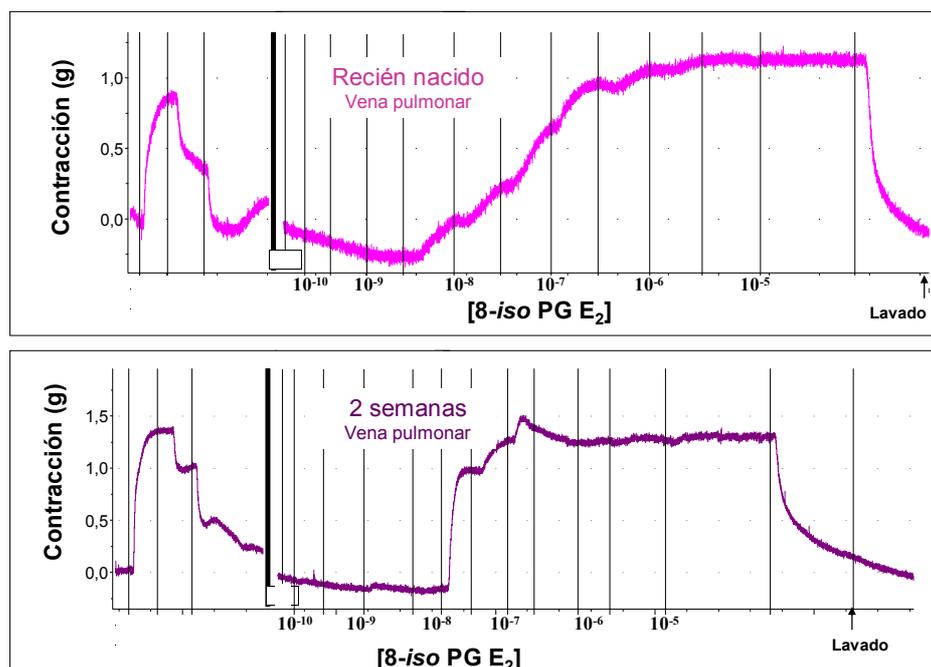


Figura 11 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-iso PGE₁ en arteria pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. **(B)** Curva concentración-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₁ en la solución nutricia. Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media (e.e.m.) de 7-13 experimentos. * $p < 0.05$, lechones recién nacidos vs. 2 semanas.

A



B

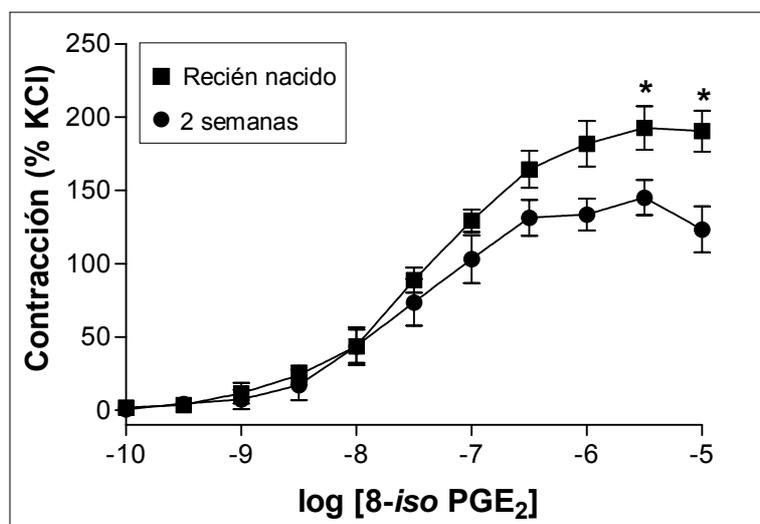
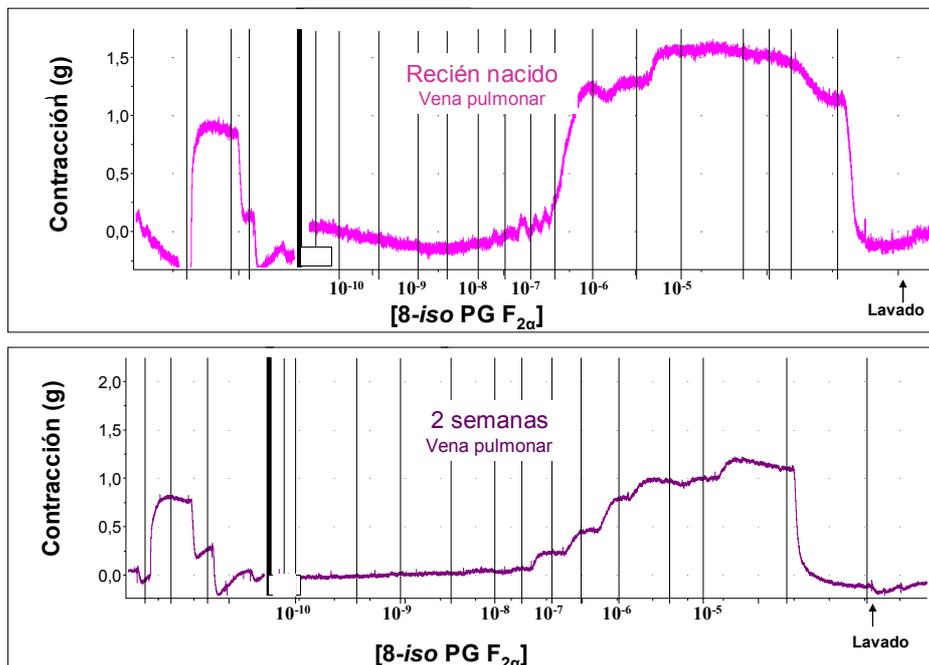


Figura 20 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-iso PGE₂ en vena pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. **(B)** Curva concentración-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva. Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6-8 experimentos. **p*<0.05, lechones recién nacidos vs. 2 semanas.

A



B

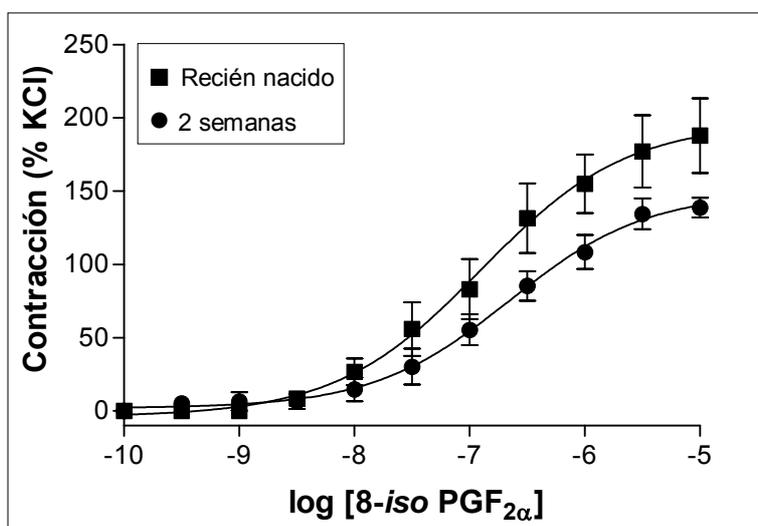
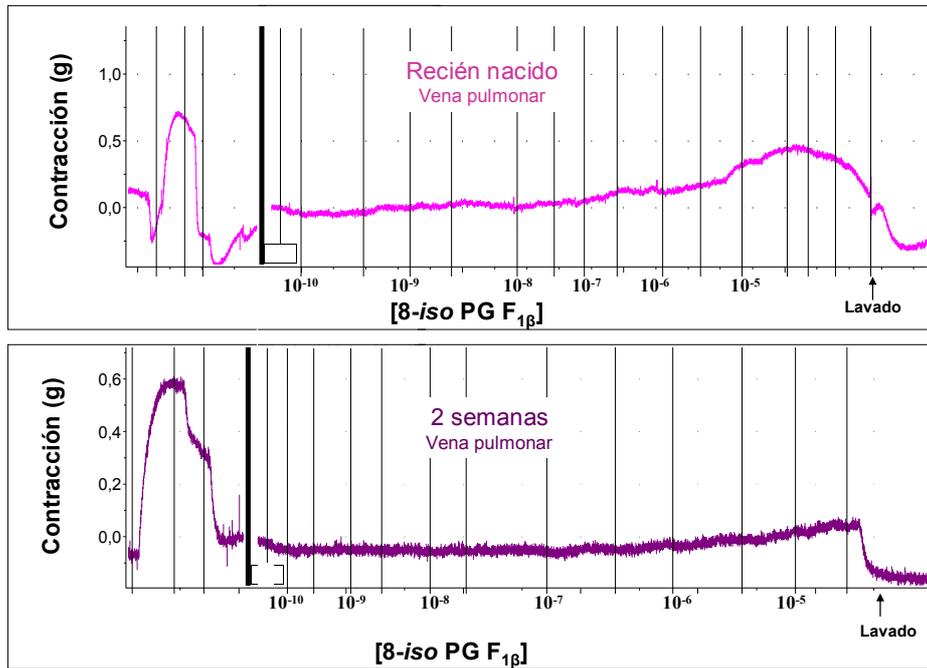


Figura 22 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por $8\text{-iso PG F}_{2\alpha}$ en vena pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. **(B)** Curva concentración-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de $8\text{-iso PG F}_{2\alpha}$ en la solución nutricia. Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6-8 experimentos.

A



B

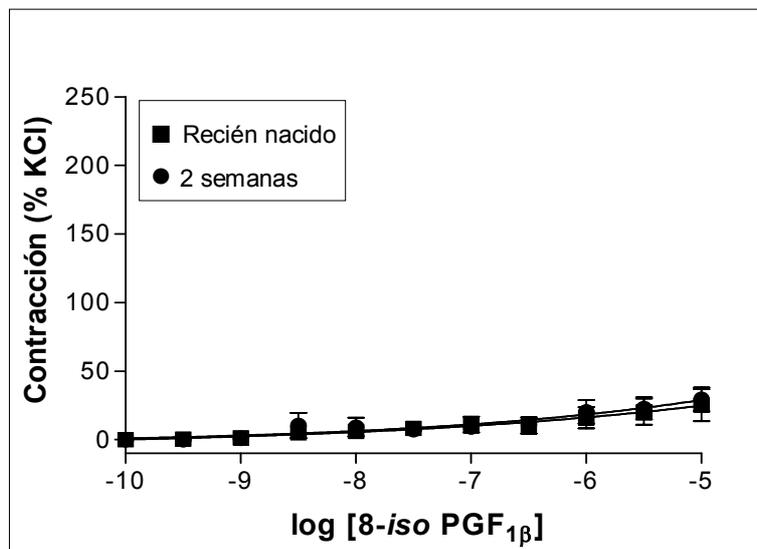
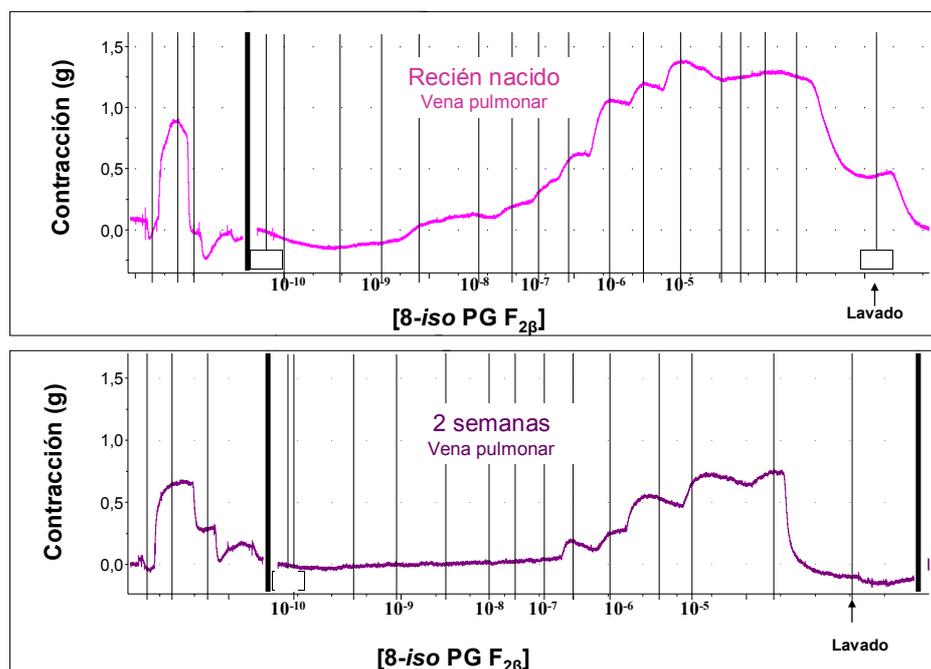


Figura 23 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-iso PGF_{1β} en vena pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. (B) Curva concentración-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGF_{1β} en la solución nutricia. Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6-7 experimentos.

A



B

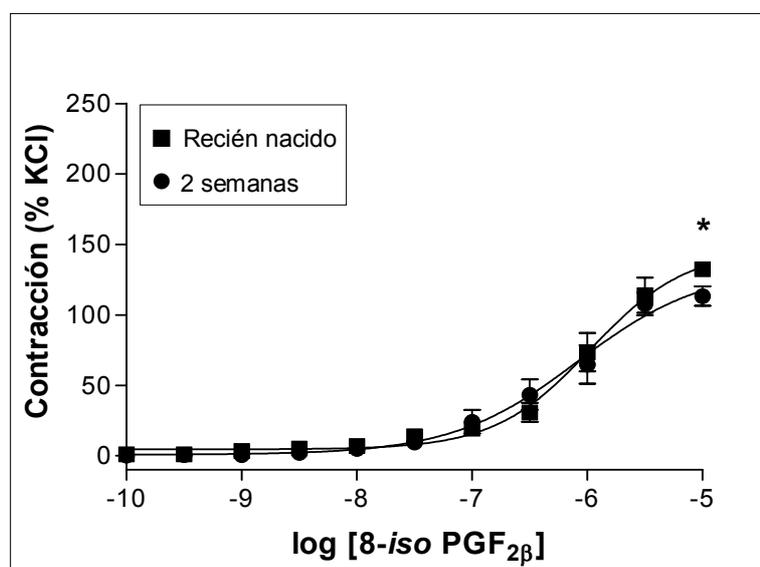
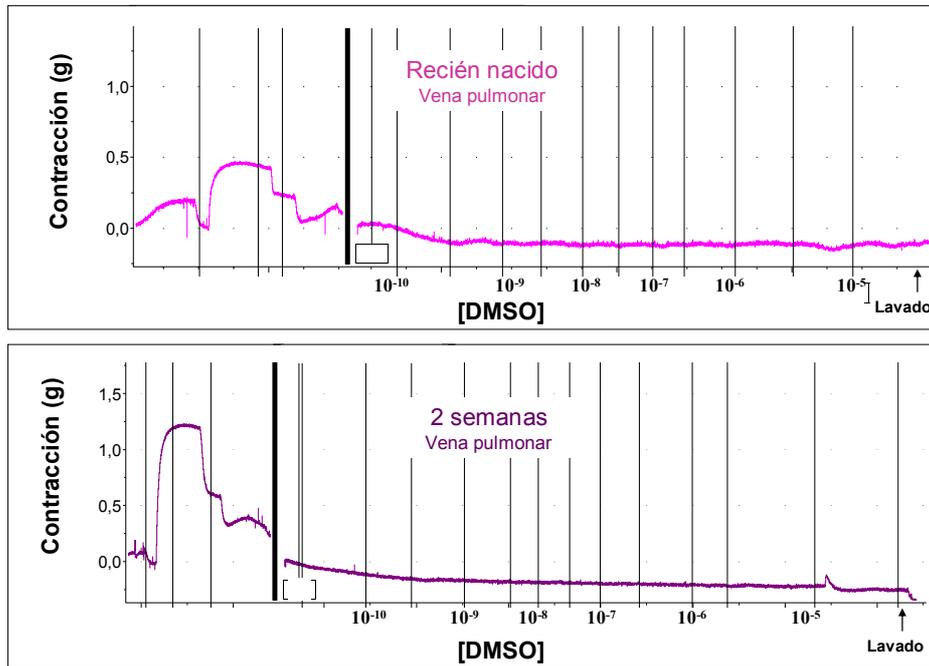


Figura 24 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-iso PGF_{2β} en vena pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. **(B)** Curva concentración-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGF_{2β} en la solución nutriticia. Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6-7 experimentos. **p*<0.05, lechones recién nacidos vs. 2 semanas.

A



B

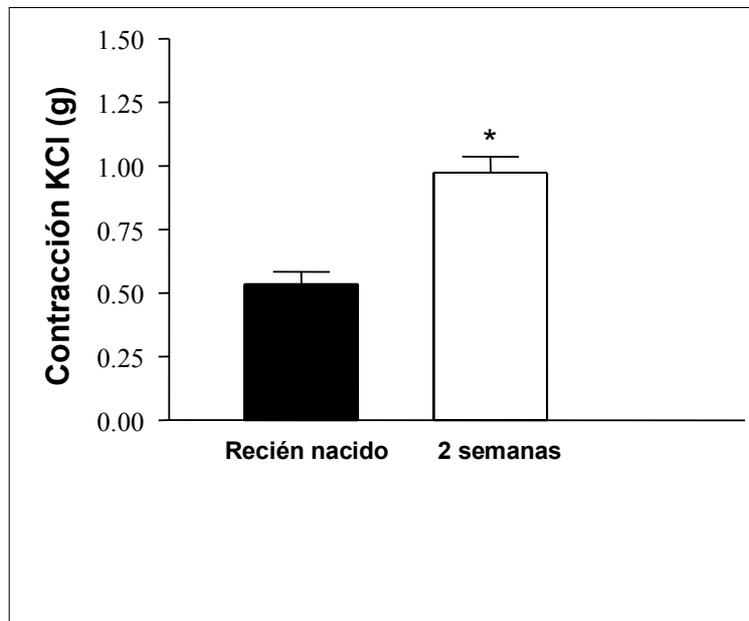


Figura 26 (A) Registro original correspondiente a ejemplos de respuesta contráctil mediada por DMSO en vena pulmonar de lechones recién nacidos (12-24 h) y de 2 semanas. (B) Respuesta contráctil inducida por 62.5 mM de KCl. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 40-49 experimentos. * $p < 0.05$, lechones recién nacidos vs. 2 semanas.

8-iso PGE₁						
		E_{max}	pD₂	-log EC_{K10}	-log EC_{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	58,21± 17,54	-6,46± 0,18	-7,27± 0,33	-5,74± 0,37	7
	2 sem	37,26± 8,13	-6,14± 0,13	-6,38± 0,28	-4,23± 0,82	13
Vena pulmonar	RN	93,13± 17,69	-5,45± 1,10	-6,40± 1,31	-6,91± 0,49	5
	2 sem	105,99± 17,18	-6,33± 0,16	-7,48± 0,31	-6,66± 0,37	7
Arteria mesentérica	RN	142,13± 29,52	-6,76± 0,44	*-6,66± 1,36	-7,49± 0,54	6
	2 sem	88,20± 35,25	-5,92± 0,25	-5,70± 0,88	-5,86± 0,51	9

Tabla 11. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGE₁ en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. RN=lechón Recién Nacido (12- 24 h); 2 sem=lechón de 2 semanas. **p*<0.05, RN vs. 2 sem.

8-iso PGE₂						
		E_{max}	pD₂	-log EC_{K10}	-log EC_{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	114,46±30,79	-6,58±0,17	-7,79±0,63	-7,26±0,53	7
	2 sem	97,81±9,99	-6,69±0,07	-6,72±0,67	-6,83±0,13	23
Vena pulmonar	RN	*198,77±14,40	-7,44±0,12	-8,94±0,23	-8,58±0,22	6
	2 sem	144,77±11,32	-7,61±0,22	-8,56±0,27	-8,13±0,27	8
Arteria mesentérica	RN	211,53±22,26	*-7,26±0,46	** -8,36±0,45	** -7,97±0,47	6
	2 sem	137,79±40,03	-5,96±0,16	-6,85±0,21	-6,26±0,29	10

Tabla 12. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGE₂ en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. **p*<0.05, RN vs. 2 sem. ***p*<0.01, RN vs. 2 sem.

8-iso PGF_{1α}						
		E_{max}	pD₂	-log EC_{K10}	-log EC_{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	88,61± 21,15	-6,41± 0,40	*-7,45± 0,54	-6,35± 0,67	6
	2 sem	12,73± 4,20	-5,82± 0,17	-5,81± 0,27	-4,33± 0,44	16
Vena pulmonar	RN	89,66± 2,68	-6,64± 0,41	-7,68± 0,35	-6,74± 0,18	5
	2 sem	61,76± 10,19	-6,30± 0,09	-7,33± 0,34	-6,18± 0,28	7
Arteria mesentérica	RN	84,99± 30,09	*-7,85± 0,54	-8,64± 0,63	-7,07± 1,18	5
	2 sem	42,89± 21,86	-5,79± 0,10	-6,59± 1,15	-4,52± 1,79	8

Tabla 13. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{1α} en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. *p<0.05, RN vs. 2 sem.

8-iso PGF_{2α}						
		E_{max}	pD₂	-log EC_{K10}	-log EC_{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	155,20± 25,92	-6,13± 0,18	-8,00± 0,52	-6,85± 0,00	6
	2 sem	139,95± 11,64	-6,14± 0,12	-7,65± 0,36	-6,52± 0,24	24
Vena pulmonar	RN	188,60± 25,45	-6,94± 0,1	-8,37± 0,16	-7,84± 0,18	6
	2 sem	141,64± 7,77	-6,79± 0,20	-8,14± 0,27	-7,59± 0,30	8
Arteria mesentérica	RN	150,65± 17,02	*-6,46± 0,21	*-8,26± 0,54	-7,55± 0,52	5
	2 sem	87,13± 24,49	-5,830,16	-6,55± 0,40	-5,59± 0,68	9

Tabla 14. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso-PGF_{2α} en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. *p<0.05, RN vs. 2 sem.

8-iso PGF _{1β}						
		E _{max}	pD ₂	-log EC _{K10}	-log EC _{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	62,61± 19,73	*-7,45± 0,61	** -8,55± 0,66	-5,45± 1,47	6
	2 sem	40,26± 30,70	-6,05± 0,47	-6,20± 0,98	-2,78± 1,05	8
Vena pulmonar	RN	25,24± 11,77	-6,74± 0,55	-7,89± 0,44	-6,31± 0,58	6
	2 sem	30,21± 9,03	-6,47± 0,27	-6,61± 0,50	-4,28± 0,92	7
Arteria mesentérica	RN	35,95± 17,61	** -7,93± 0,70	-8,49± 0,86	-7,86± 1,27	6
	2 sem	12,95± 9,26	-6,00	-3,48± 3,48	-6,27	9

Tabla 15. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{1β} en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. **p*<0.05, RN vs. 2 sem. ***p*<0.01, RN vs. 2 sem.

8-iso PGF _{2β}						
		E _{max}	pD ₂	-log EC _{K10}	-log EC _{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	117,31± 20,70	-6,24± 0,18	** -8,05± 0,45	-6,96± 0,38	7
	2 sem	123,11± 12,00	-5,88± 0,13	-7,00± 0,32	-6,07± 0,21	28
Vena pulmonar	RN	135,46± 7,01	-6,05± 0,03	-7,80± 0,37	-6,79± 0,09	6
	2 sem	106,77± 9,54	-6,38± 0,15	-7,43± 0,31	-6,82± 0,21	7
Arteria mesentérica	RN	143,30± 9,30	-6,35± 0,12	*-9,14± 0,72	*-8,03± 0,47	6
	2 sem	32,20± 26,74	-6,03± 0,26	-6,49± 0,93	-5,38± 1,07	8

Tabla 16. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2β} en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. **p*<0.05, RN vs. 2 sem. ***p*<0.01, RN vs. 2 sem.

U46619						
		Emax	pD ₂	-log EC _{K10}	-log EC _{K30}	n
Arteria pulmonar	RN	273,59± 21,08	-8,46± 0,36	-9,43± 0,16	-9,18± 0,16	9
	2 sem	282,02± 20,62	-7,92± 0,13	-9,29± 0,16	-8,70± 0,13	23
Vena pulmonar	RN	214,70± 34,74	-8,69± 0,23	-9,72± 0,14	-9,43± 0,18	6
	2 sem	198,43± 22,20	-9,10± 0,23	-9,96± 0,25	-9,69± 0,32	5
Arteria mesentérica	RN	206,29± 20,47	** -8,46± 0,03	* -9,45± 0,17	** -9,15± 0,07	3
	2 sem	204,37± 23,07	-7,21± 0,20	-8,23± 0,21	-7,83± 0,22	9

Tabla 17. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de U46619 en las arteria y vena pulmonares y en la arteria mesentérica. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}. **p*<0.05, RN vs. 2 sem. ***p*<0.01, RN vs. 2 sem.

Receptor TP ...

1.2 Participación del receptor TP en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos.

Medimos los efectos del bloqueo del receptor TP (por SQ 29,548) en la respuesta mediada por los isoprostanos en arterias pulmonares, mesentéricas y venas pulmonares del cerdo recién nacido y de 2 semanas de edad:

1.2.1 Relajación mediada por SQ 29,548 (10^{-7} M) tras contracción inducida por los isoprostanos y por U46619.

En este grupo de experimentos, se procedió a contraer los vasos con 8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1 α} , 8-*iso* PGF_{1 β} , 8-*iso* PGF_{2 α} y 8-*iso* PGF_{2 β} a una concentración de 10^{-5} M o con ET-1 (10^{-7} M). Una vez estabilizada la contracción, se añadió SQ 29,548 (10^{-7} M). Se observó como éste revertía entre un 50% y un 100% la contracción máxima desencadenada por los isoprostanos y por U46619 en arterias pulmonares y mesentéricas tanto en lechones de 12-24 horas como en los de 2 semanas. En las venas pulmonares esta reversión fue incluso mayor, llegando a alcanzar el 100% para la mayoría de los isoprostanos (**Figuras 35,36 y 37**). Por el contrario, el SQ 29,548 (10^{-7} M) no produjo ningún efecto sobre la contracción inducida por ET-1 (**Figuras 35,36 y 37**).

1.2.2 Inhibición de la contracción inducida por los isoprostanos y por U46619 en presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

En este grupo de experimentos, los vasos fueron incubados con SQ 29,548 (10^{-8} M) al inicio de la curva de concentración-respuesta y se mantuvo el fármaco durante ésta. Se observó que la contracción desarrollada por los isoprostanos y por U46619 en las arterias pulmonares de lechones de 2 semanas disminuía de forma significativa o quedaba abolida en los experimentos en presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M). (**Figuras 38-44**).

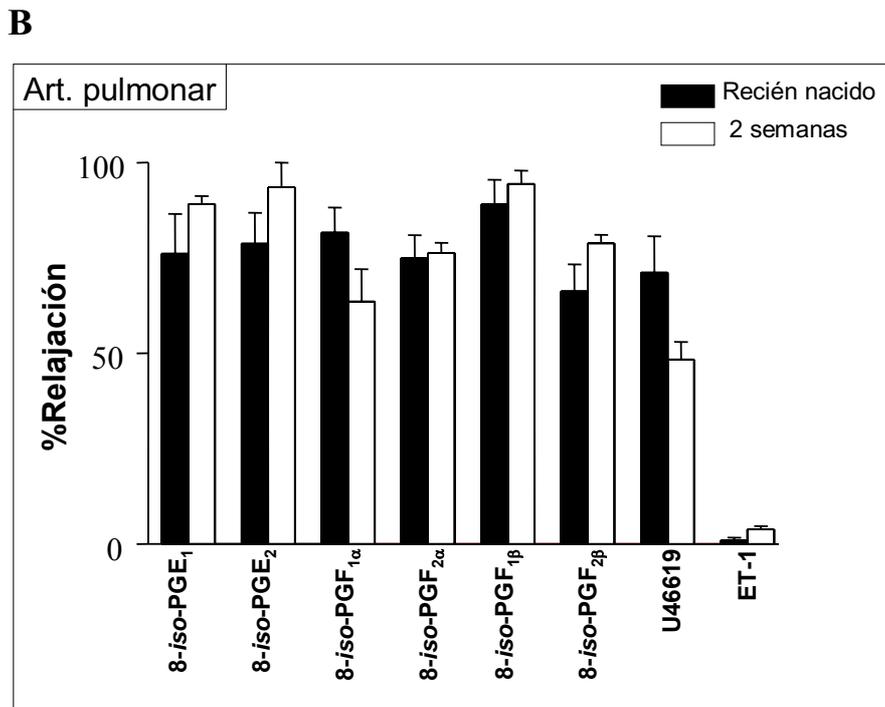
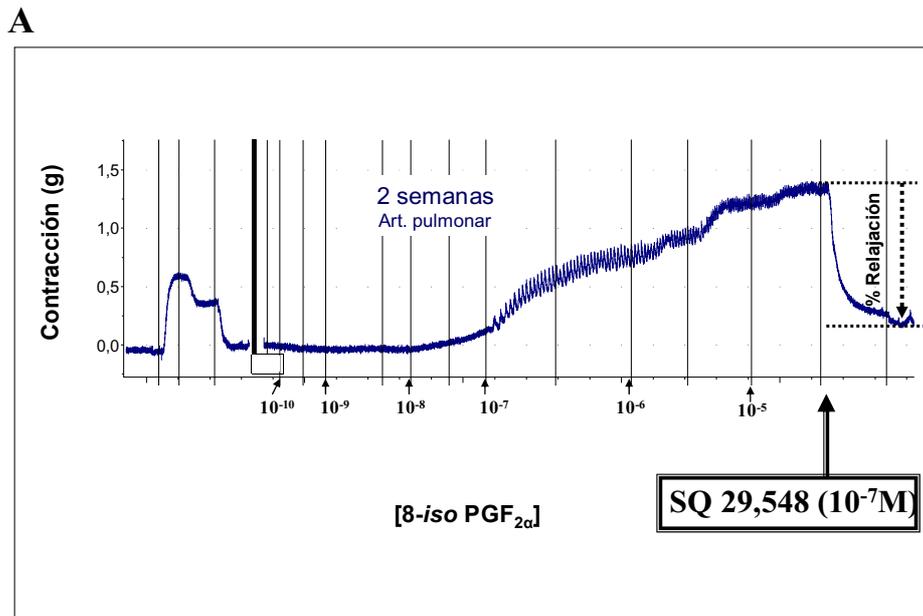
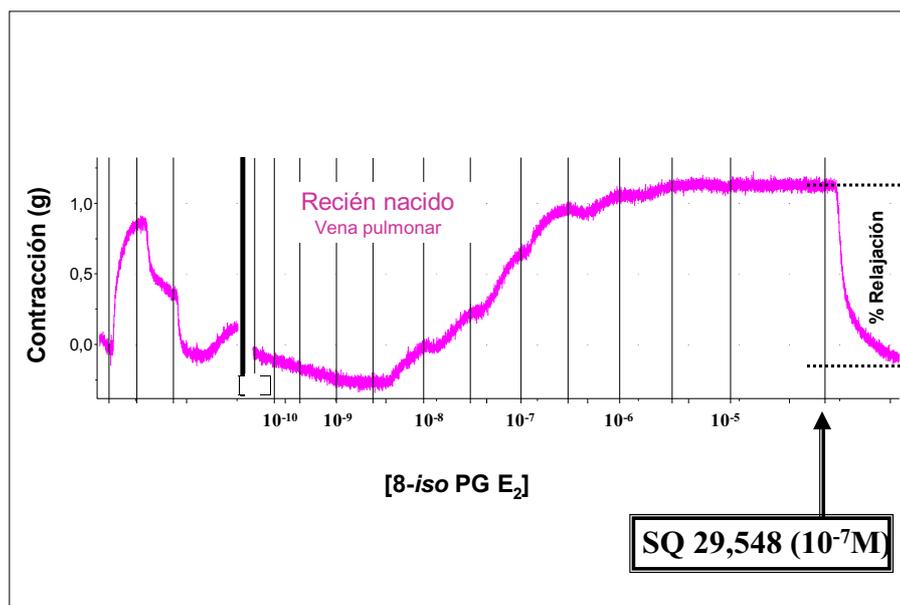


Figura 35. (A) Registro original en donde se observa la relajación mediada por SQ 29,548 (10^{-7} M) tras la contracción ejercida por uno de los isoprostanos a 10^{-5} M.

(B) Reversión de las contracciones mediadas por 8-iso PGE₁, 8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{1β}, 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGF_{2β} y U46619 a 10^{-5} M y endotelina-1 a 10^{-7} M en arteria pulmonar de lechones recién nacidos y de dos semanas tras la administración en la solución nutricia de SQ 29,548 (10^{-7} M). El efecto se calcula como porcentaje de la contracción máxima que ha sido revertida. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 4-7 experimentos. * $p < 0.05$, recién nacido vs. 2 semanas.

A



B

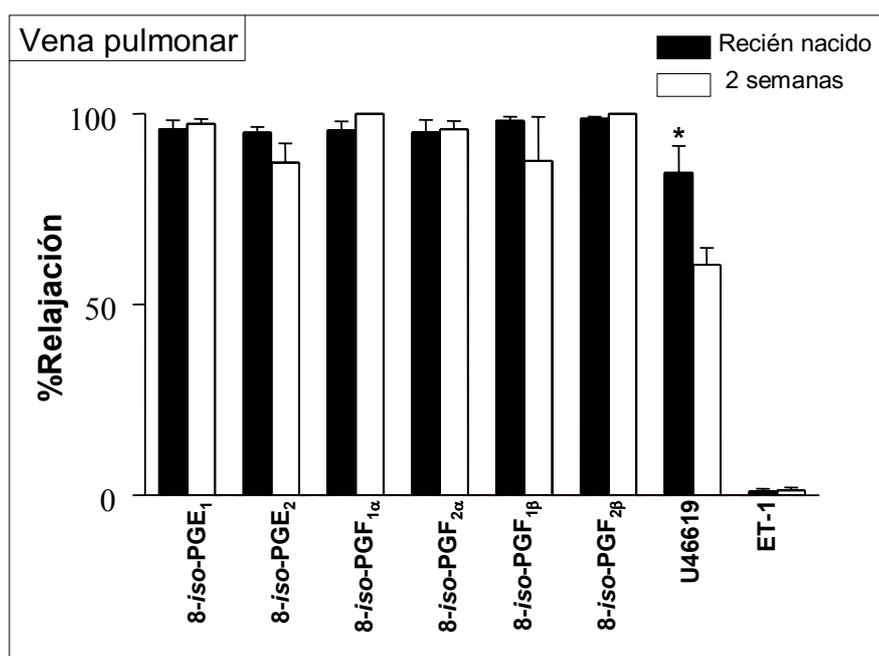
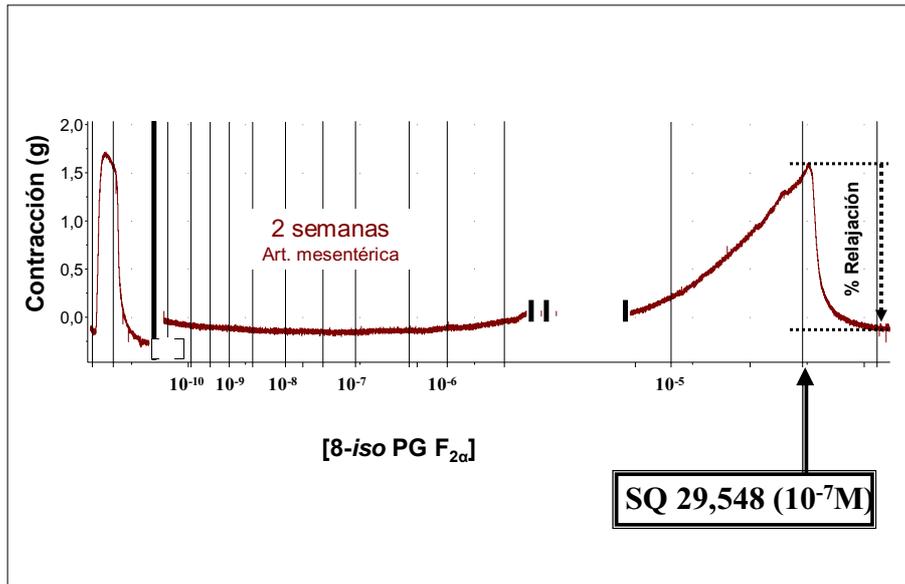


Figura 36. (A) Registro original en donde se observa la relajación mediada por SQ 29,548 (10^{-7} M) tras la contracción ejercida por uno de los isoprostanos a 10^{-5} M.

(B) Reversión de las contracciones mediadas por 8-iso PGE₁, 8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{1β}, 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGF_{2β} y U46619 a 10^{-5} M y endotelina-1 a 10^{-7} M en vena pulmonar de lechones recién nacidos y de dos semanas tras la administración en la solución nutricia de SQ 29,548 (10^{-7} M). El efecto se calcula como porcentaje de la contracción máxima que ha sido revertida. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$, recién nacido vs. 2 semanas.

A



B

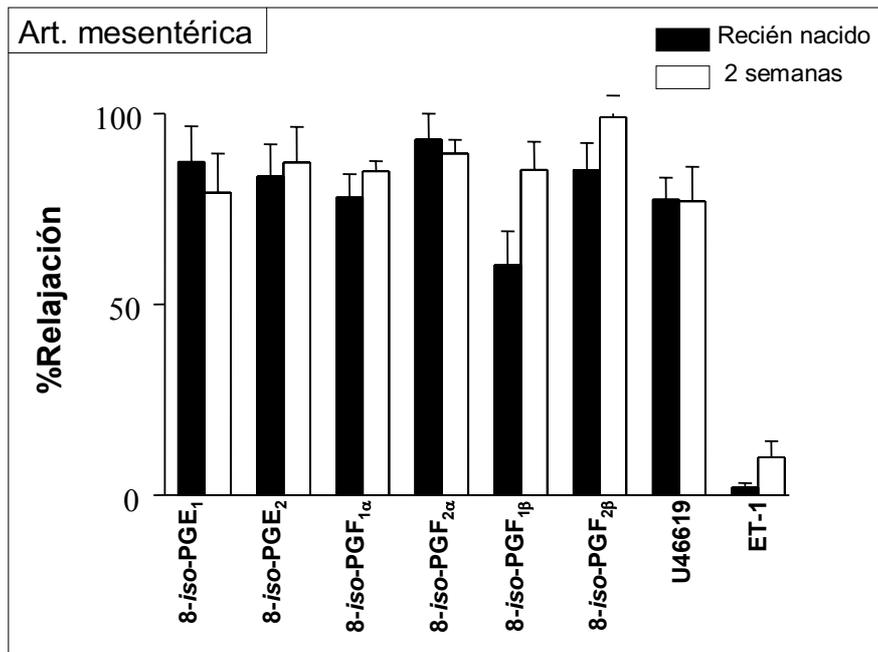


Figura 37. (A) Registro original en donde se observa la relajación mediada por SQ 29,548 (10^{-7} M) tras la contracción ejercida por uno de los isoprostanos a 10^{-5} M.

(B) Reversión de las contracciones mediadas por 8-iso PGE₁, 8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{1β}, 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGF_{2β} y U46619 a 10^{-5} M y endotelina-1 a 10^{-7} M en arteria mesentérica de lechones recién nacidos y de dos semanas tras la administración en la solución nutricia de SQ 29,548 (10^{-7} M). El efecto se calcula como porcentaje de la contracción máxima que ha sido revertida. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$, recién nacido vs. 2 semanas.

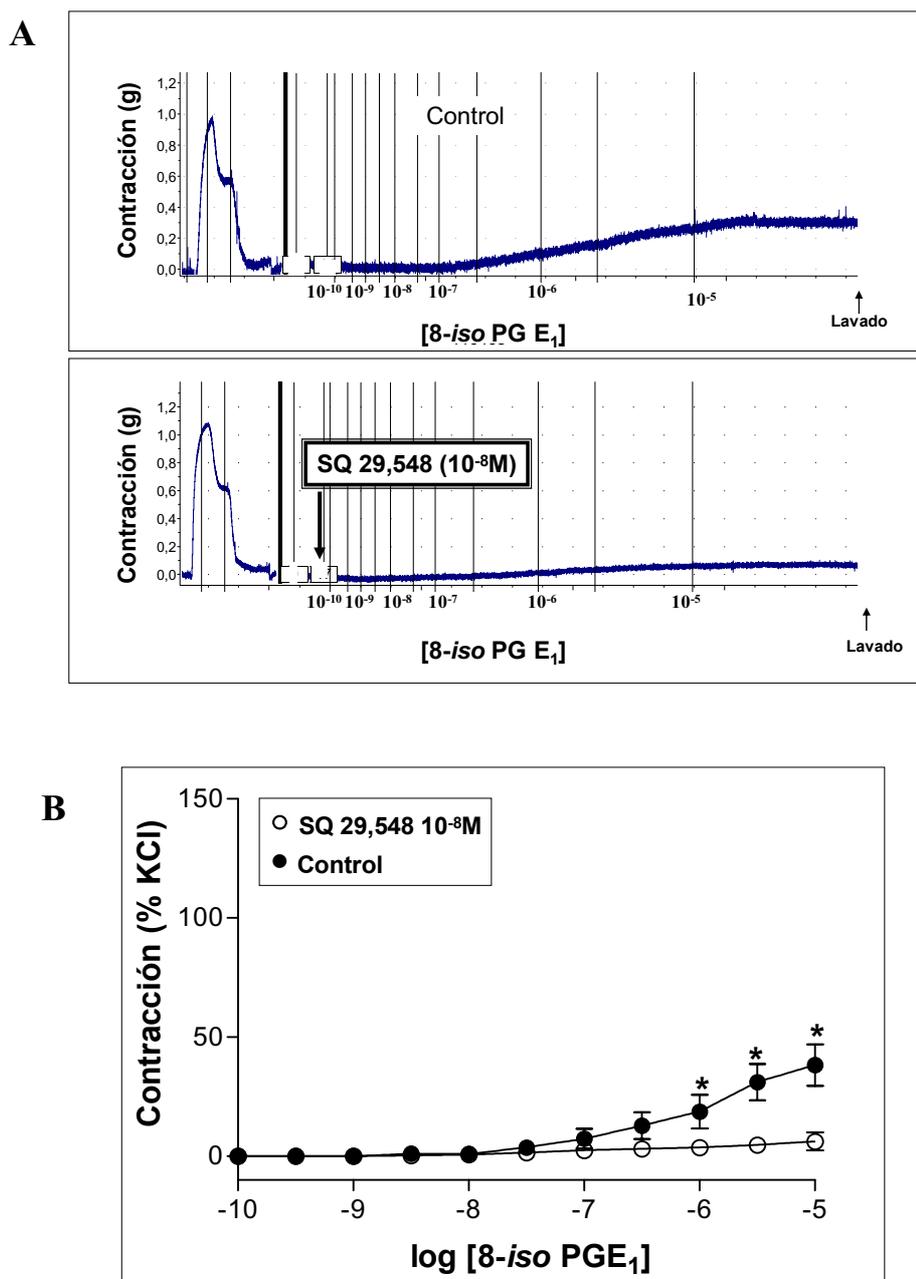


Figura 38. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso PGE₁ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₁ en la solución nutricia. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 12 experimentos. * $p < 0.05$, contror vs. presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

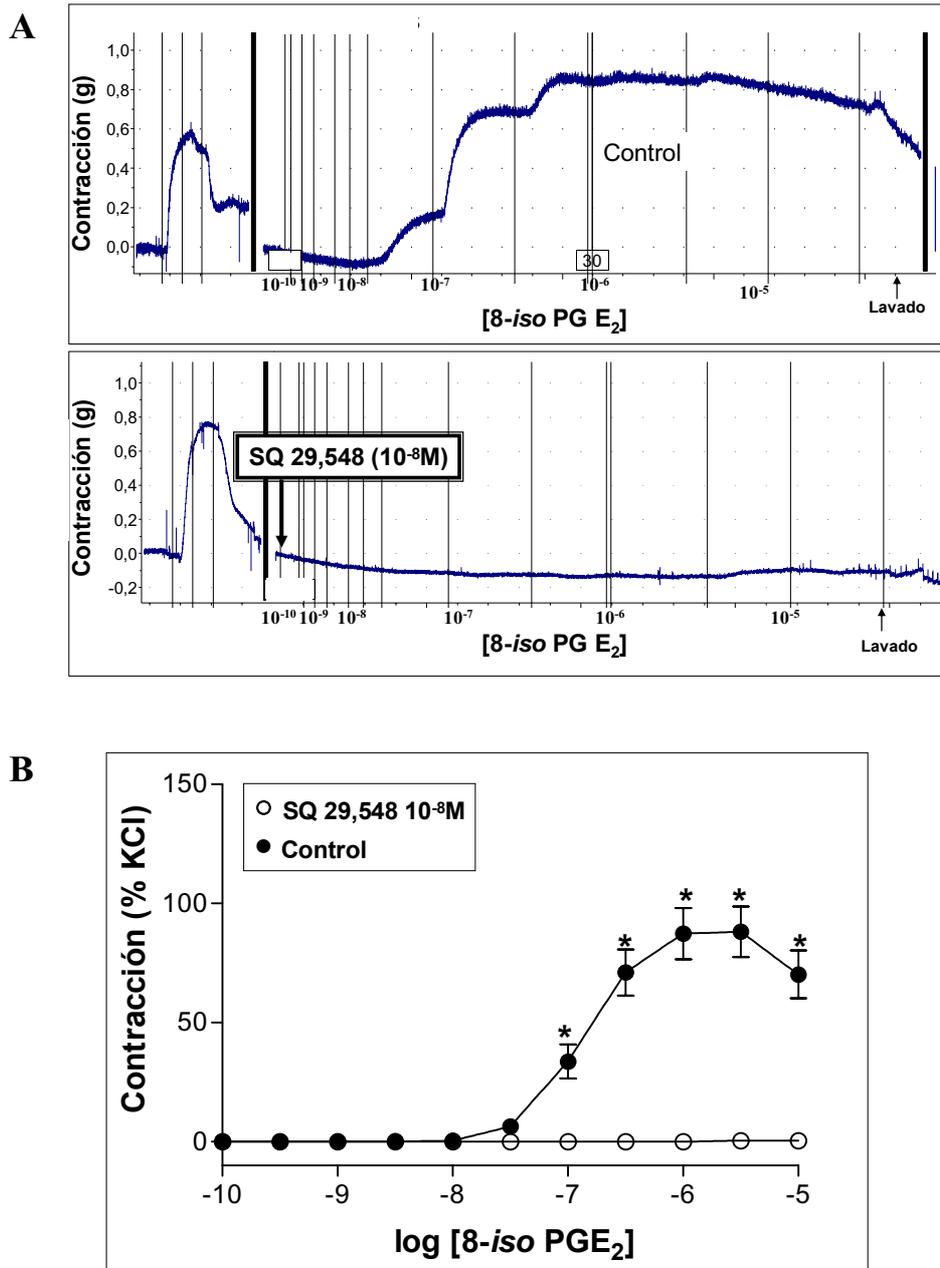


Figura 39. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 11 experimentos. * $p < 0.05$, control vs. presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

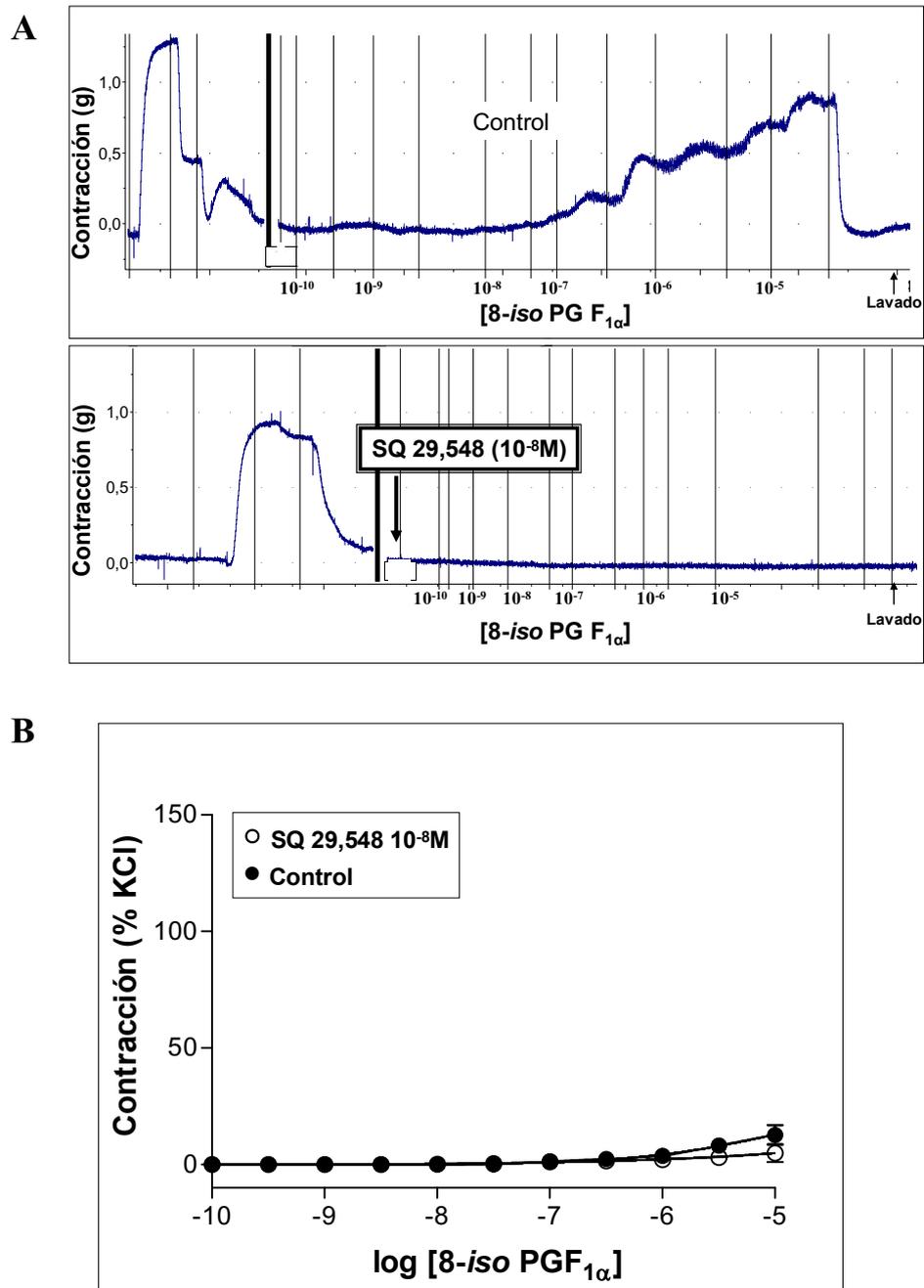


Figura 40. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso $\text{PGF}_{1\alpha}$ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso $\text{PGF}_{1\alpha}$ en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 14 experimentos.

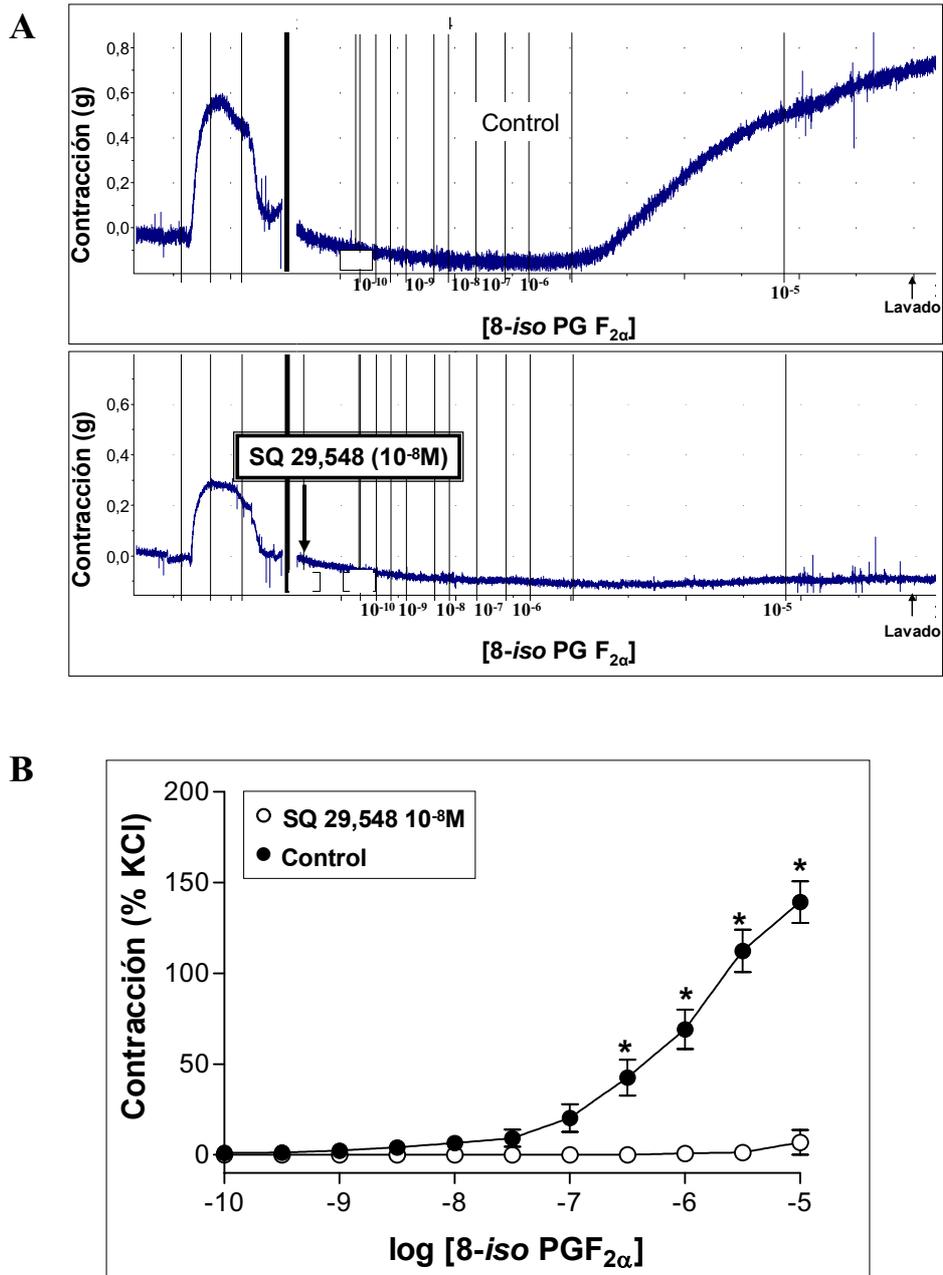


Figura 41. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 10 experimentos. * $p < 0.05$, contror vs. presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

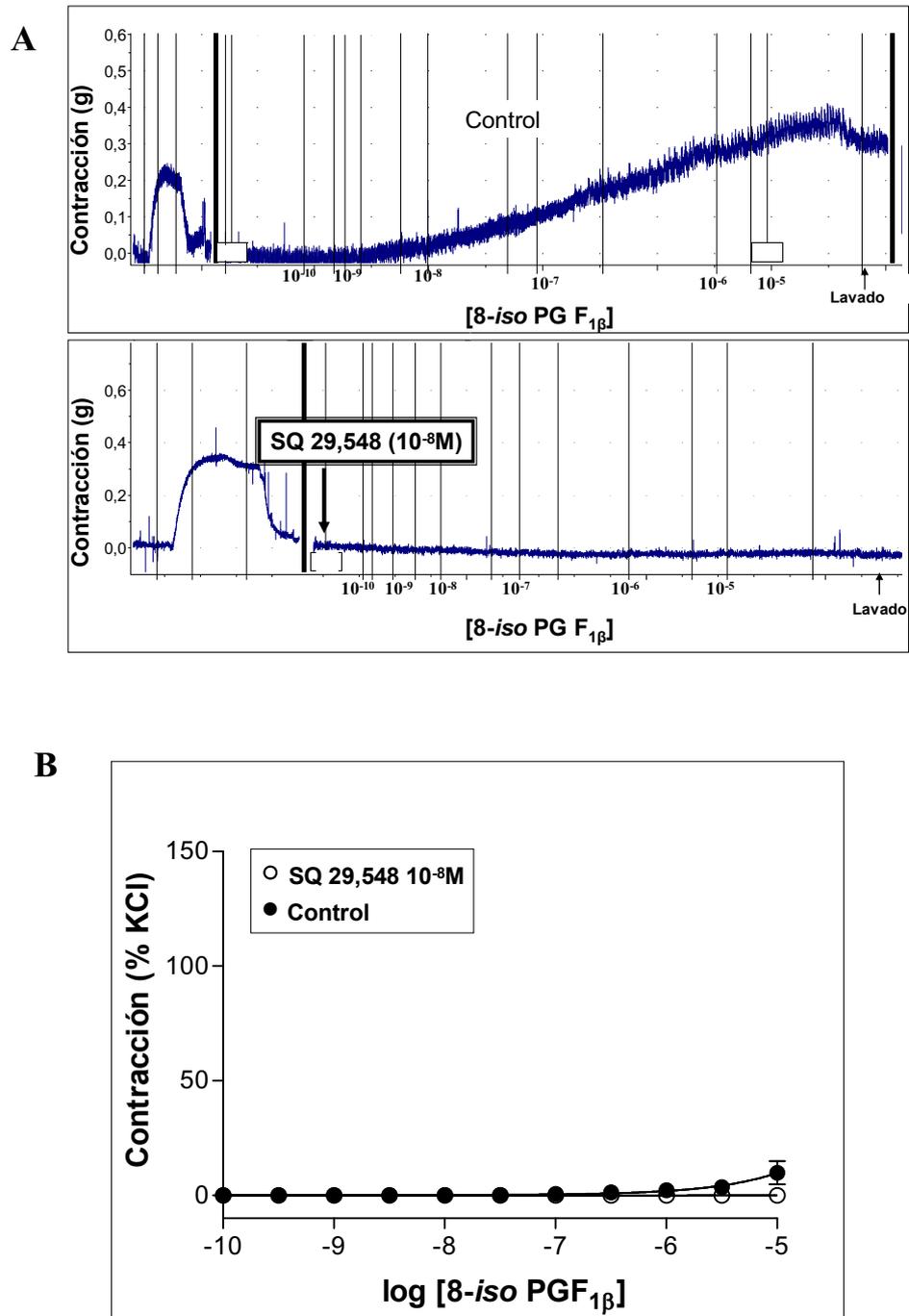


Figura 42. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso PGF_{1β} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGF_{1β} en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 experimentos.

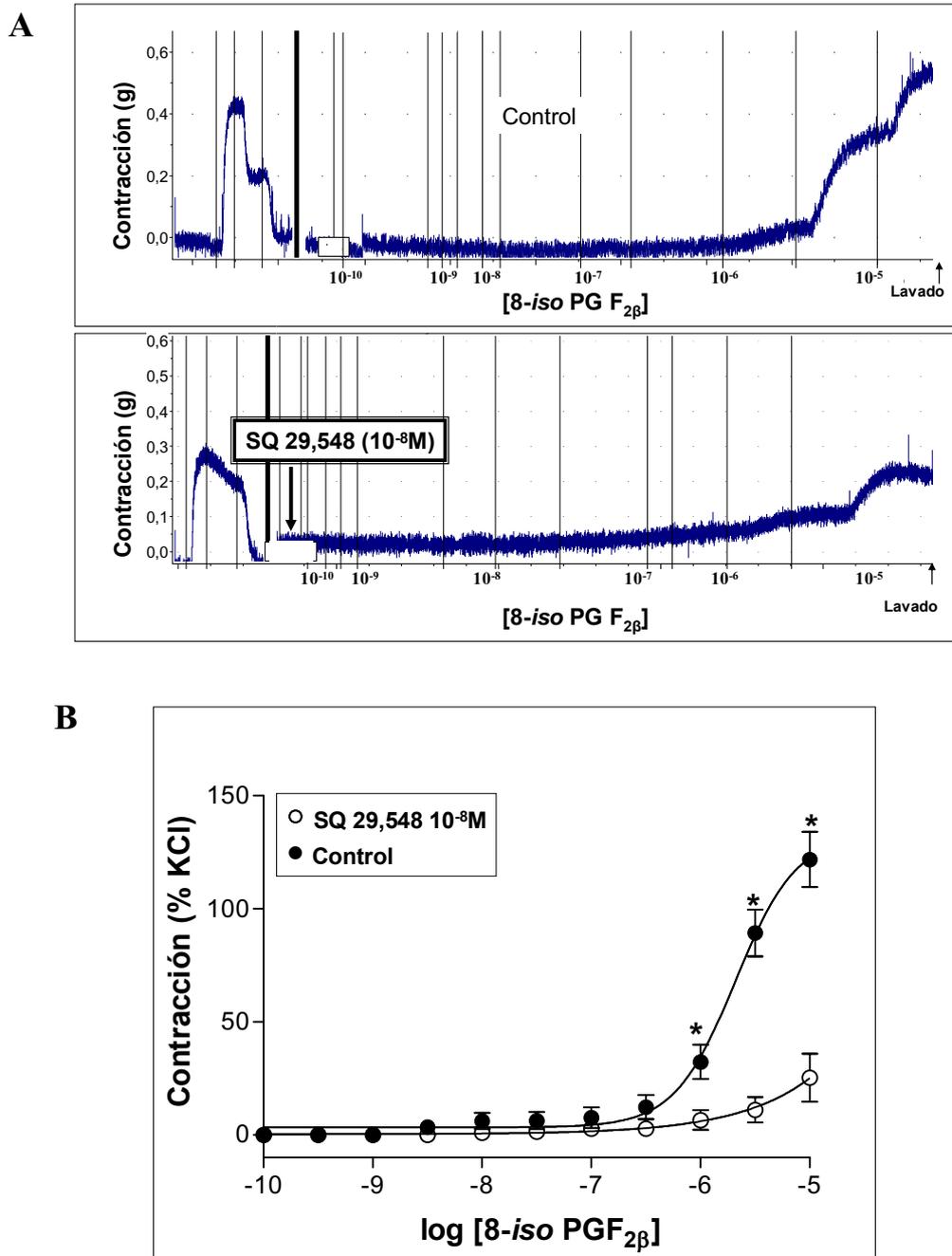


Figura 43. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGF_{2β} en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 11 experimentos. * $p < 0.05$, contror vs. presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

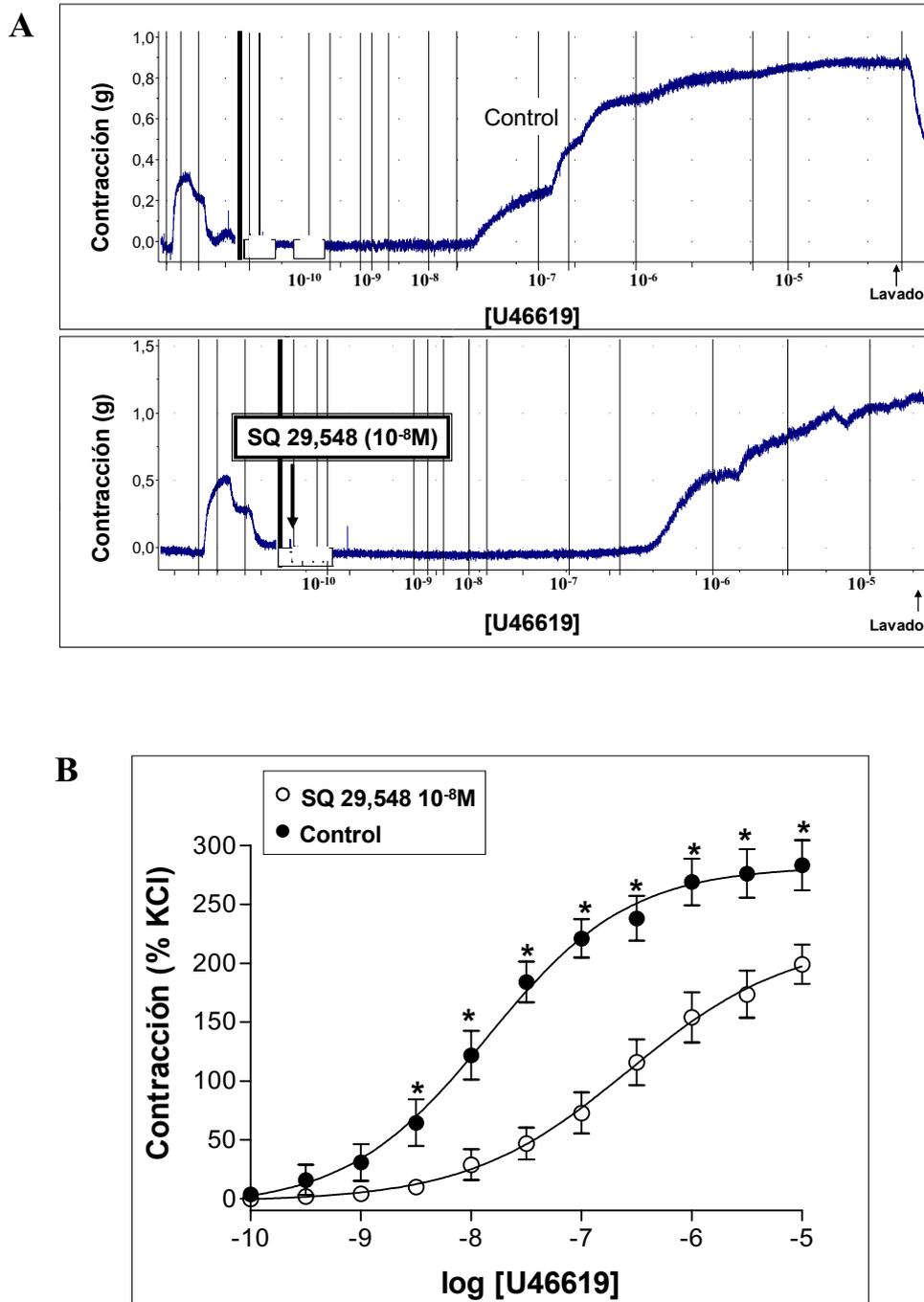


Figura 44. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de contracción (control y en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (10^{-8} M)) mediada por U46619 en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curvas de concentración-respuesta obtenidas incrementando de forma acumulativa la concentración de U46619 en la solución nutritiva. Se comparan los efectos contráctiles en presencia o ausencia (control) de SQ 29,548 (10^{-8} M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de la contracción desarrollada por 62.5 mM de KCl en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 10 experimentos. * $p < 0.05$, control vs. presencia de SQ 29,548 (10^{-8} M).

Mecanismos de transducción...

1.3 Mecanismos de transducción de la respuesta contráctil inducida por isoprostanos y por U46619.

Fármacos que redujeron la contracción:

Observamos que la contracción mediada por los isoprostanos en estudio (8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β}) y por U46619 en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas, se vio marcadamente reducida o abolida en presencia del inhibidor de la tirosina cinasa (genisteína) y de los inhibidores de la Rho cinasa (Y27632 e hidroxifasudilo). El efecto fue muy significativo para Y27632. En lo que respecta al U46619, ninguno de los inhibidores anuló por completo la contracción, aunque la reducción de la misma se hizo patente sobre todo con los inhibidores de la Rho cinasa. (**Figuras 45,46,51,52,57,58,63 y 64; Tablas: 18,21,24 y 27**).

Fármacos que no modificaron la contracción:

La contracción mediada por los isoprostanos en estudio (8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β}) y por U46619 no se modificó en presencia del inhibidor de la cinasa de la proteína C (queleritrina), del inhibidor de la cinasa de la proteína activadora del mitógeno (PD 98059) o por el inhibidor de la p38-kinasa (SB 203580). (**Figuras 47,48,53,54,59,60,65 y 66; Tablas 19,22,25 y 28**).

1.4 Papel del endotelio y de la vía de la COX en la respuesta contráctil inducida por isoprostanos

La inhibición de la COX (por indometacina) no afectó de forma significativa la contracción mediada por los isoprostanos (8-iso PGE₂, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β}) o por U46619 en la arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (**Figuras 49,50,55,56,61,62,67 y 68; Tablas: 20,23,26 y 29**). Tampoco se vio modificada la contracción de forma significativa en los experimentos llevados a cabo tras eliminación del endotelio (**Figuras 49,50,55,56,61,62,67 y 68; Tablas: 20,23,26 y 29**).

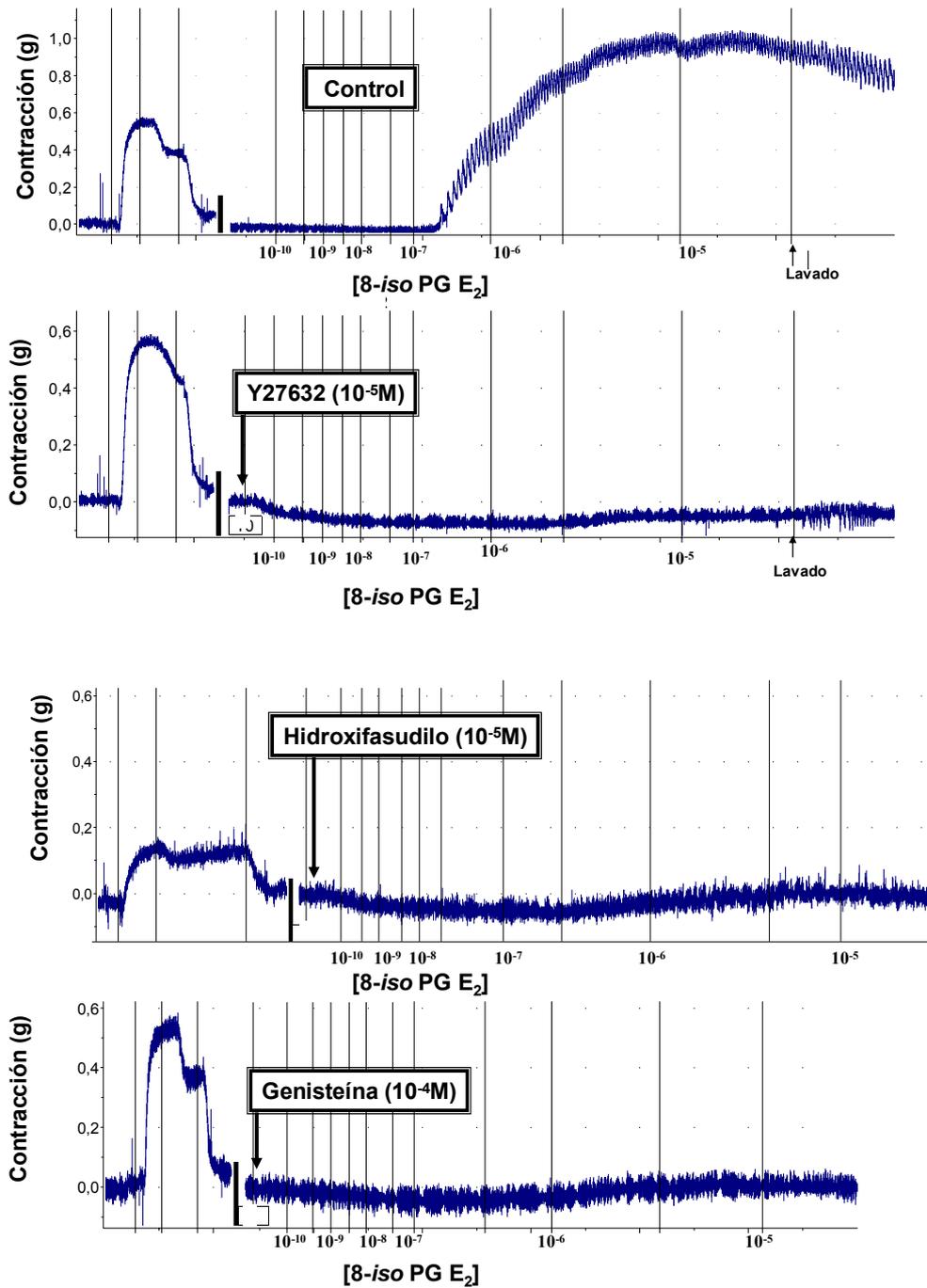


Figura 45. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que se consigue reducir dicha contracción.

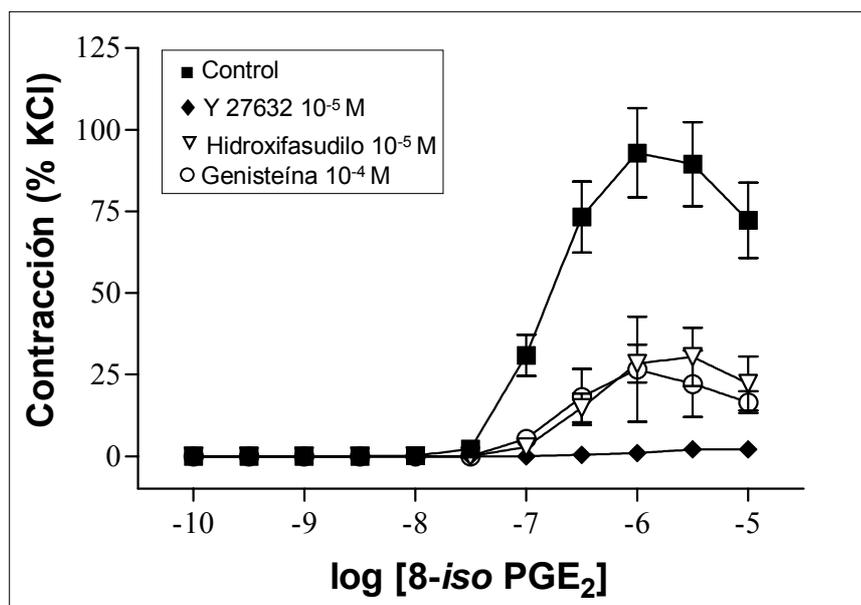


Figura 46. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵ M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵ M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴ M). Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 experimentos.

8-iso PGE₂	Control	Y27632	Hidroxifasudil	Genisteína
E_{max}	100,76 ±12,49	2,04 ±1,30	33,73 ±7,57	27,69 ±15,83
pD₂	-6,76 ±0,13	-6,13 ±0,25	-6,43 ±0,05	-6,55 ±0,12
-log EC_{K10}	-7,30 ±0,13	-3,83 ±0,83	-6,67 0,15	-6,63 ±0,63
-log EC_{K30}	-6,84 ±0,20	4,26 ±6,24	-5,47 ±0,42	-4,99 ±1,85

Tabla 18. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

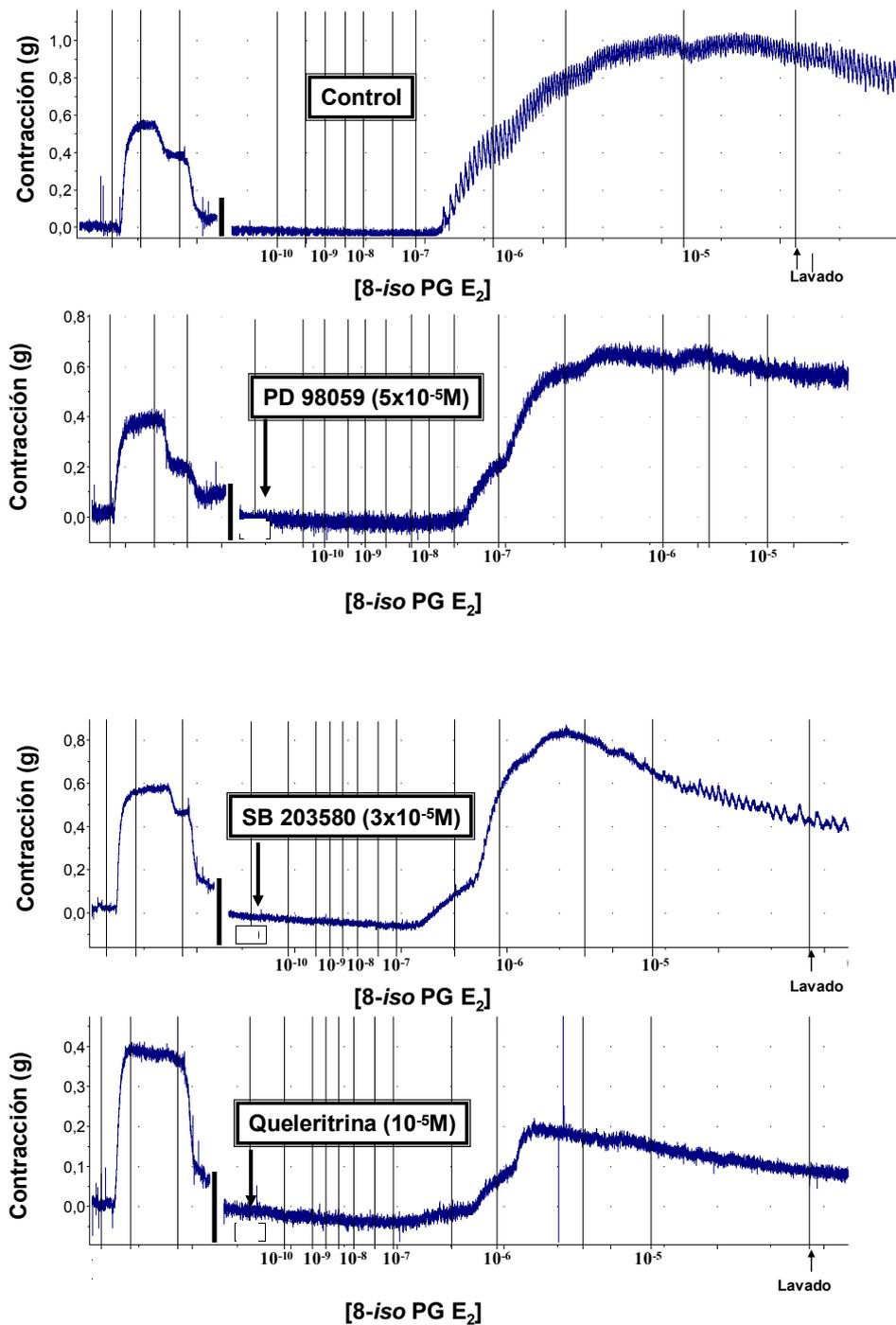


Figura 47. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que no se modifica dicha contracción.

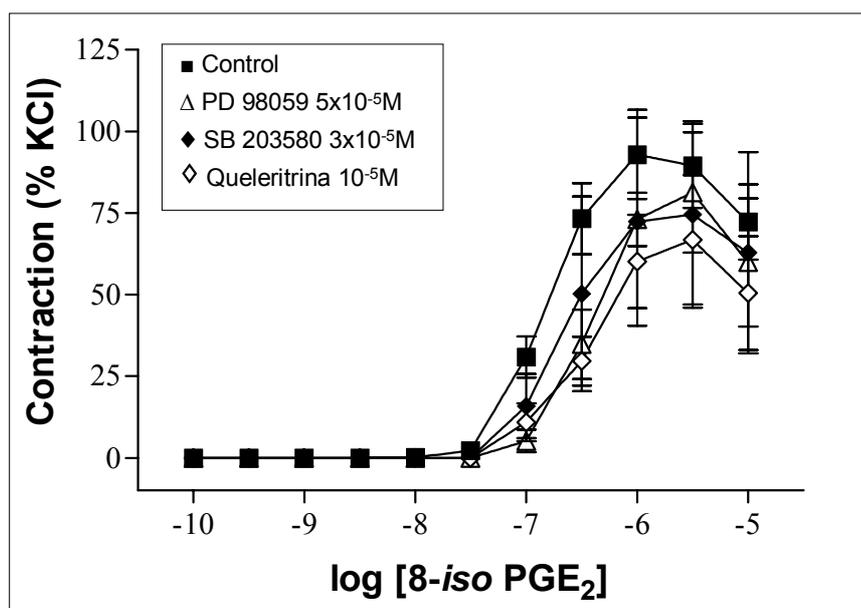


Figura 48. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de MAP, PD 98059 (5×10^{-5} M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Cada punto representa la media \pm eem de 5-7 experimentos.

8-iso PGE₂	Control	PD 98059	SB 203580	Queleritrina
Emax	100,76 $\pm 12,49$	90,15 $\pm 15,90$	85,67 $\pm 34,46$	75,63 $\pm 19,45$
pD₂	-6,76 $\pm 0,13$	-6,42 $\pm 0,13$	-6,41 $\pm 0,14$	-6,44 $\pm 0,10$
-log EC_{K10}	-7,30 $\pm 0,13$	-6,97 $\pm 0,14$	-6,72 $\pm 0,36$	-6,90 $\pm 0,19$
-log EC_{K30}	-6,84 $\pm 0,20$	-6,62 $\pm 0,11$	-5,68 $\pm 0,80$	-6,50 $\pm 0,14$

Tabla 19. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de MAP, PD 98059 (5×10^{-5} M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

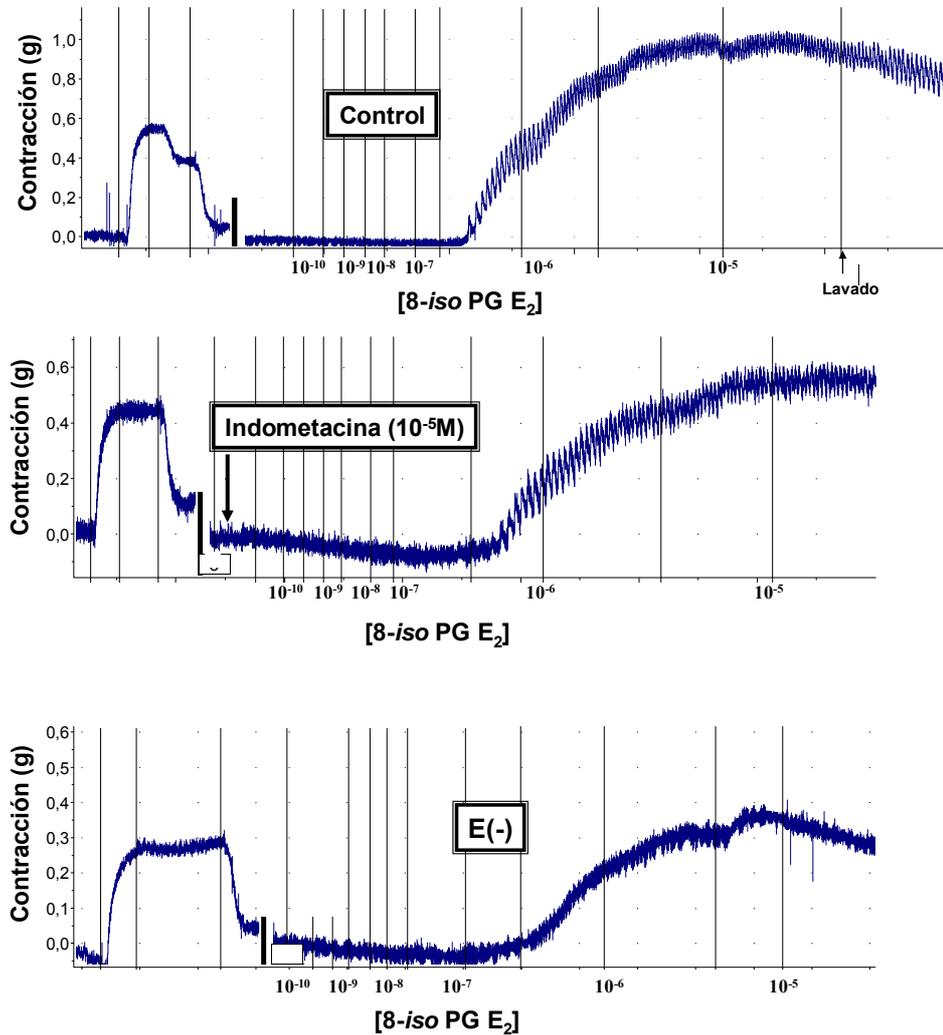


Figura 49. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados en ausencia y en presencia de indometacina y tras eliminación del endotelio.

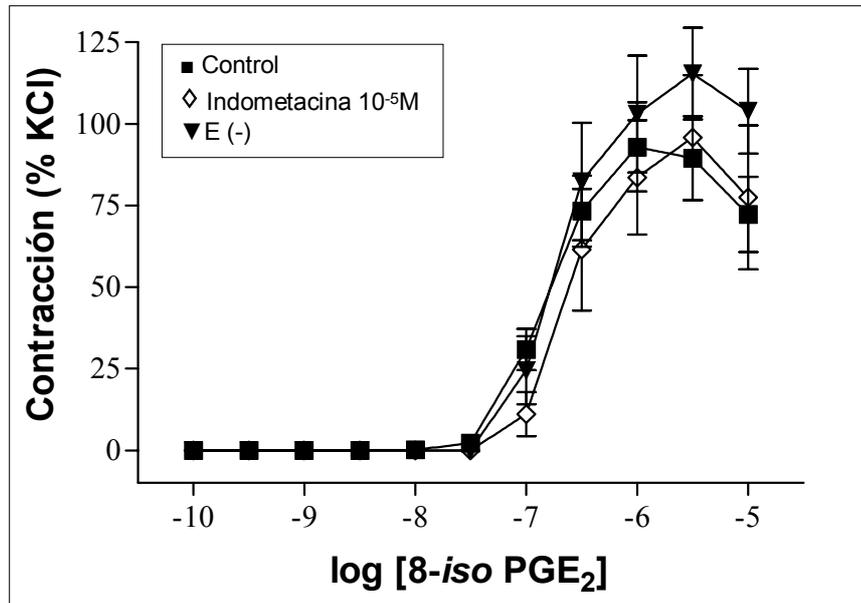


Figura 50. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio. Cada punto representa la media ± eem de 6 experimentos.

8-iso PGE₂	Control	Indometacina	E (-)
E_{max}	100,76 ±12,49	103,56 ±18,58	115,98 ±14,21
pD₂	-6,76 ±0,13	-6,53 ±0,12	-6,65 ±0,12
-log EC_{K10}	-7,30 ±0,13	-7,08 ±0,10	-7,15 ±0,12
-log EC_{K30}	-6,84 ±0,20	-6,73 ±0,17	-6,91 ±0,17

Tabla 20. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

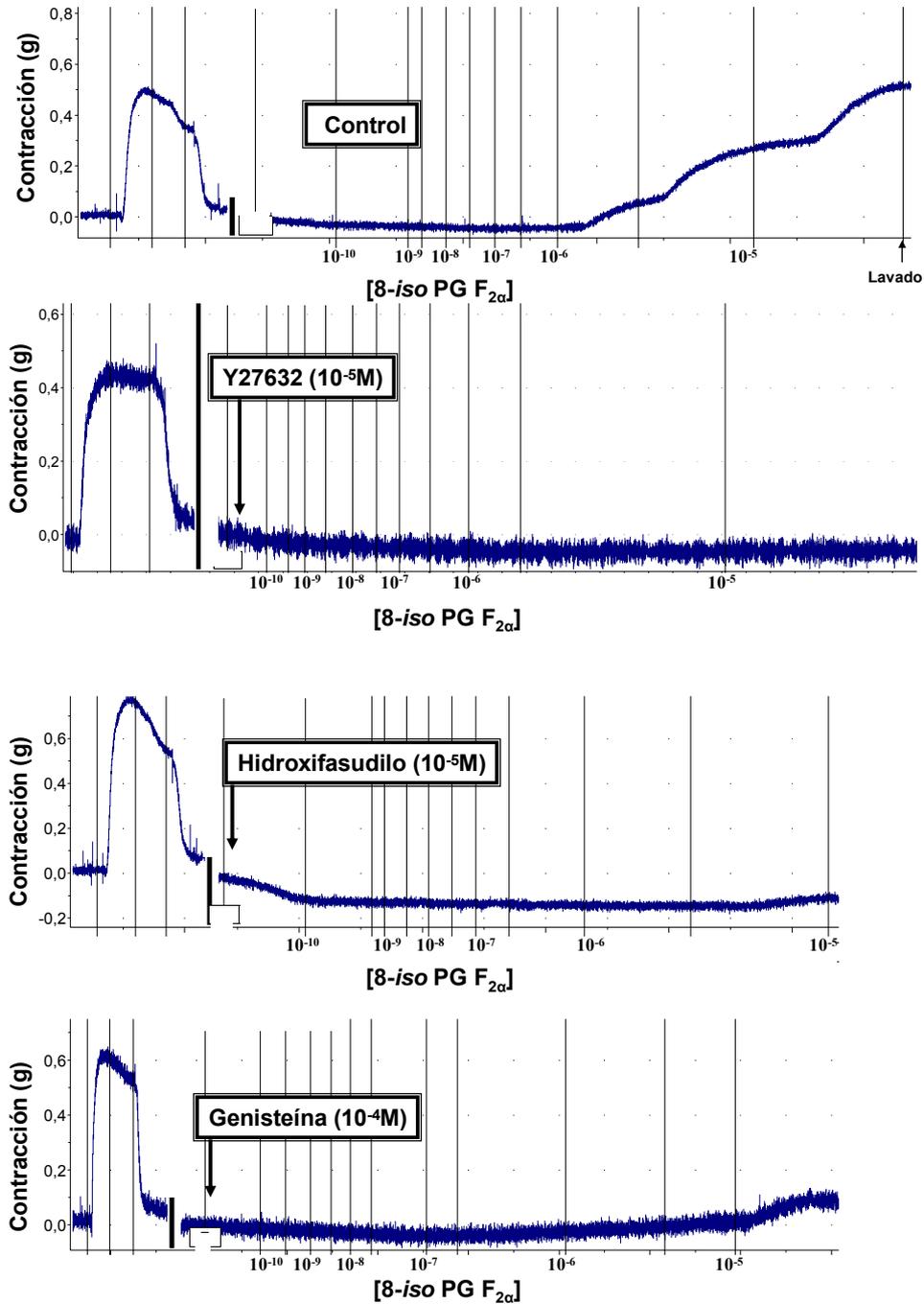


Figura 51. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGF_{2 α} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que se consigue reducir dicha contracción.

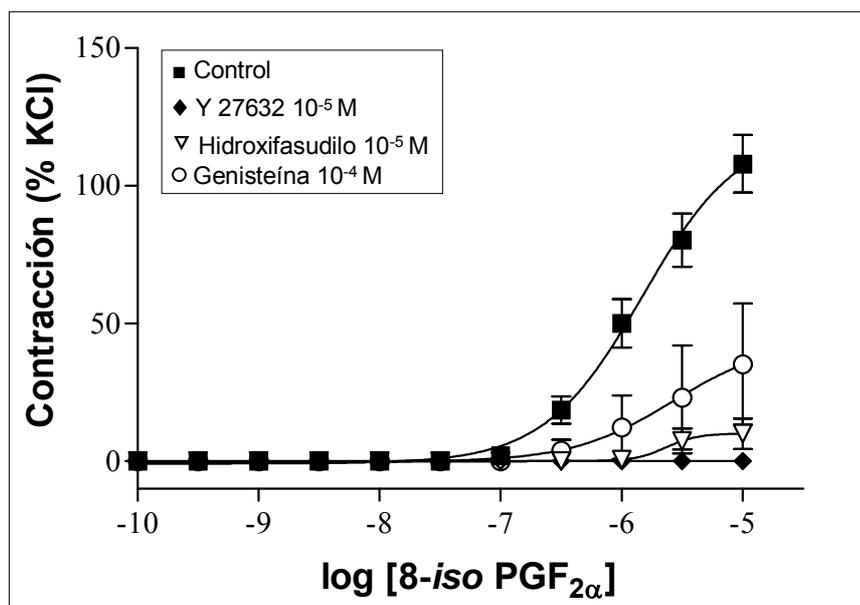


Figura 52. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2α} en lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵ M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵ M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴ M). Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 experimentos.

8-iso PGF_{2α}	Control	Y27632	Hidroxifasudil	Genisteína
E_{max}	105,11 ±11,75	0 ±0	10,00 ±5,51	35,26 ±21,96
pD₂	-5,97 ± 0,08	-	-5,63 ±0,11	-5,67 ±0,18
-log EC_{K10}	-6,68 ±0,08	-	-5,10 ±0,49	-6,06 ±0,44
-log EC_{K30}	-6,28 ±0,13	-	-3,02 ±1,17	-5,42 ±0,63

Tabla 21. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵ M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵ M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴ M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

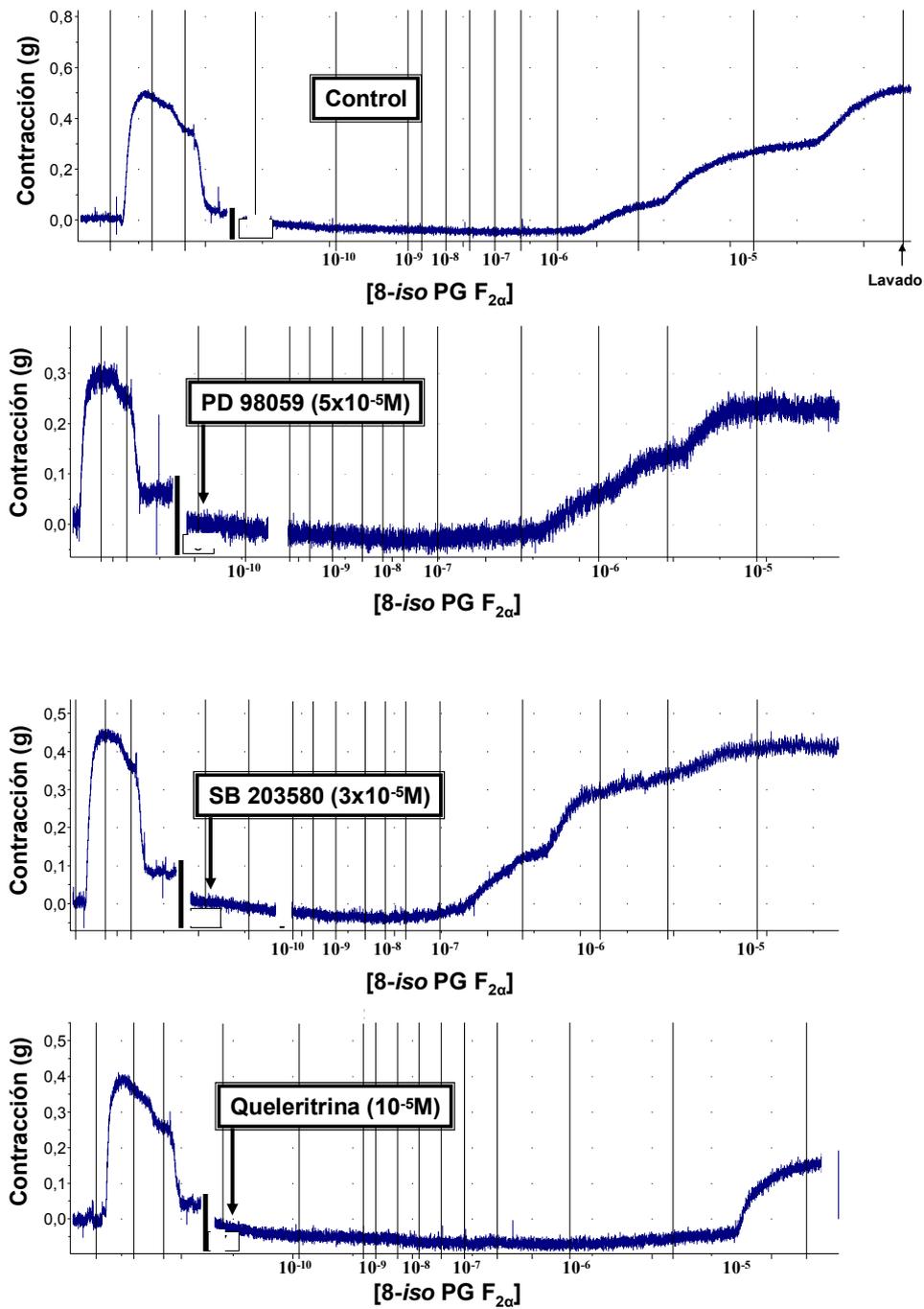


Figura 53. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que se no se modifica dicha dicha contracción.

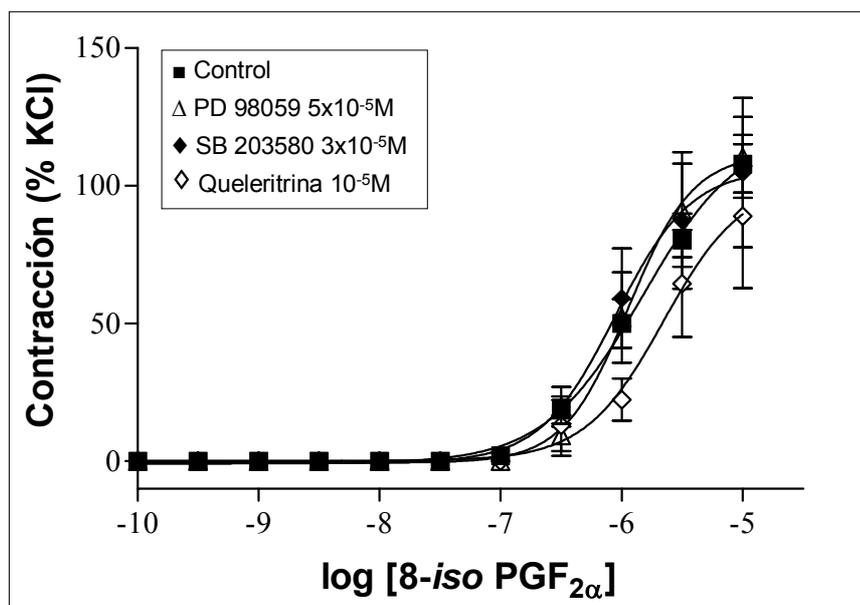


Figura 54. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de la MAP, PD 98059 (5x10⁻⁵ M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3x10⁻⁵ M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, quelerritrina (10⁻⁵ M). Cada punto representa la media ± eem de 5-7 experimentos.

8-iso PGF_{2α}	Control	PD 98059	SB 203580	Quelerritrina
Emax	105,11 ±11,75	110,36 ±14,67	104,77 ±27,14	89,00 ±26,08
pD₂	-5,97 ± 0,08	-5,92 ±0,09	-5,95 ±0,13	-5,77 ±0,09
-log EC_{K10}	-6,68 ±0,08	-6,63 ±0,10	-6,49 ±0,36	-6,57 ±0,13
-log EC_{K30}	-6,28 ±0,13	-6,22 ±0,12	-5,83 ±0,67	-6,11 ±0,08

Tabla 22. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de la MAP, PD 98059 (5x10⁻⁵ M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3x10⁻⁵ M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, quelerritrina (10⁻⁵ M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

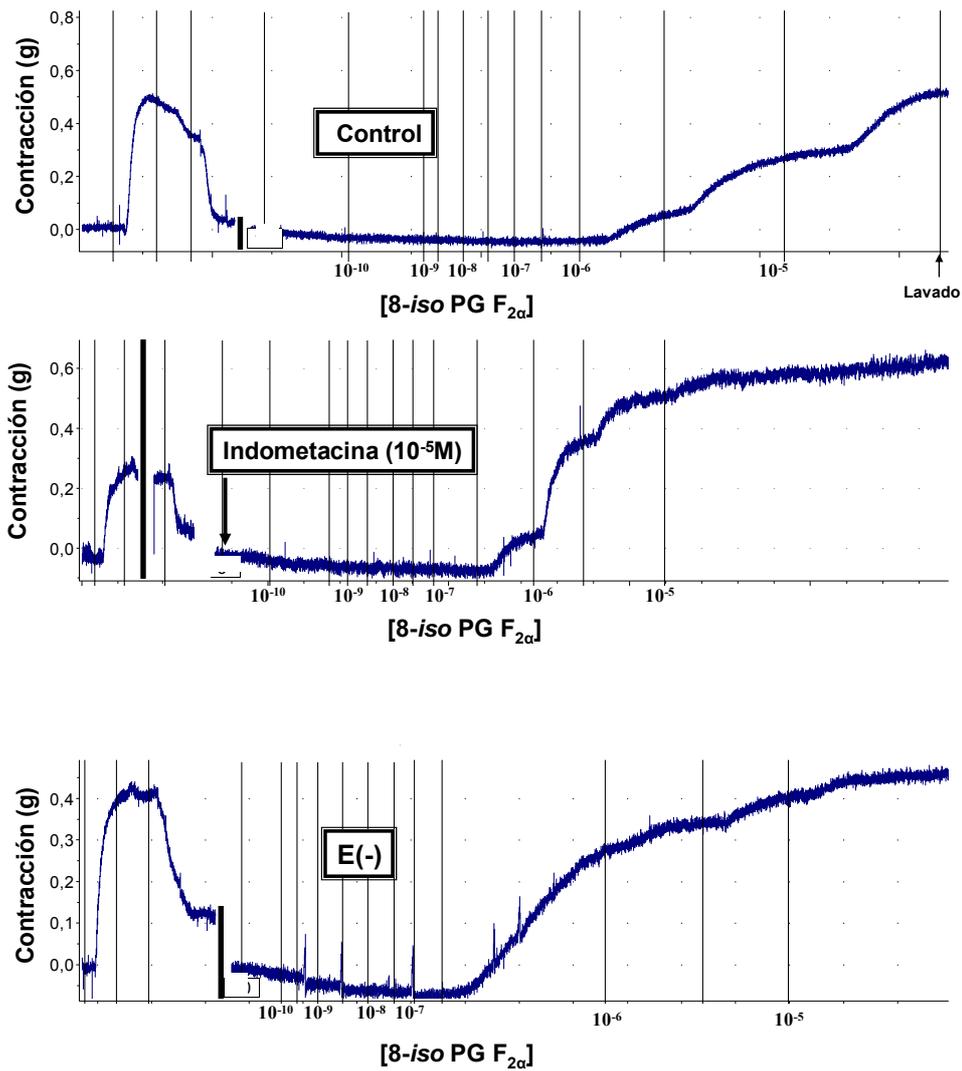


Figura 55. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PG F_{2α} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados en ausencia y en presencia de indometacina y tras eliminación del endotelio.

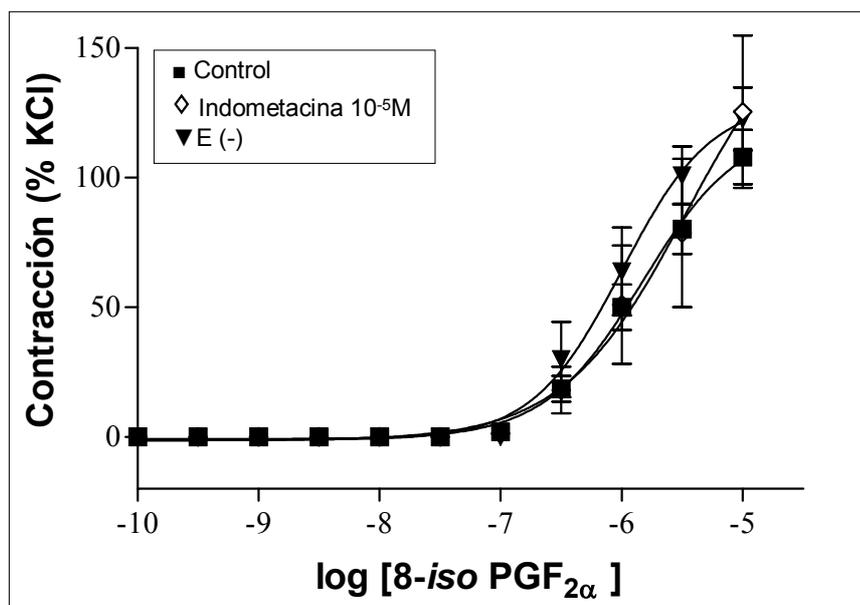


Figura 56. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio. Cada punto representa la media ± eem de 6 experimentos.

8-iso PGF_{2α}	Control	Indometacina	E (-)
E_{max}	105,11 ±11,75	125,49 ±29,42	122,62 ±12,12
pD₂	-5,97 ± 0,08	-5,76 ±0,15	-6,04 ±0,12
-log EC_{K10}	-6,68 ±0,08	-6,29 ±0,38	-6,75 ±0,14
-log EC_{K30}	-6,28 ±0,13	-5,66 ±0,66	-6,42 ±0,16

Tabla 23. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2α} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

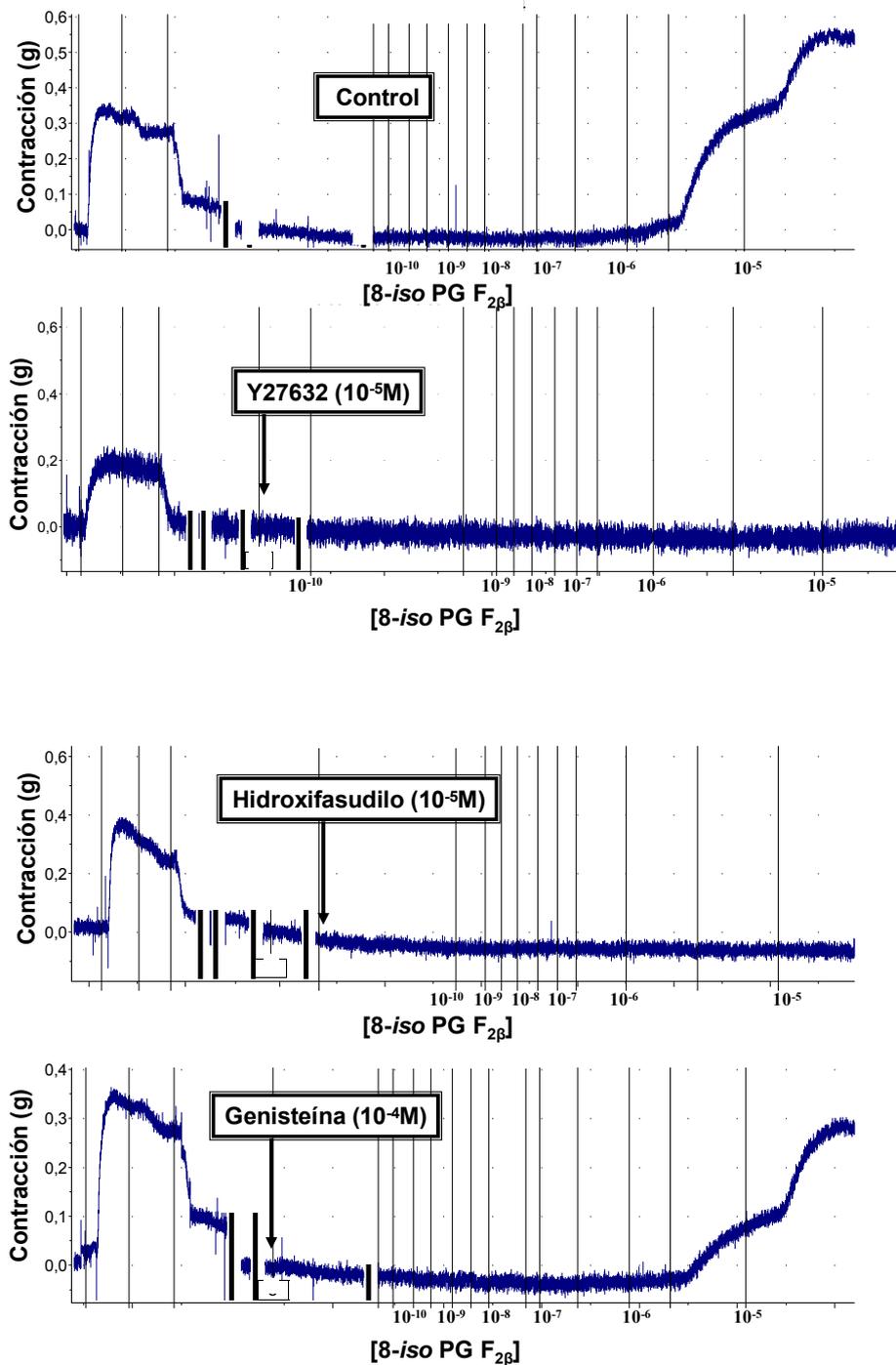


Figura 57. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGF_{2α} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que se consigue reducir dicha contracción.

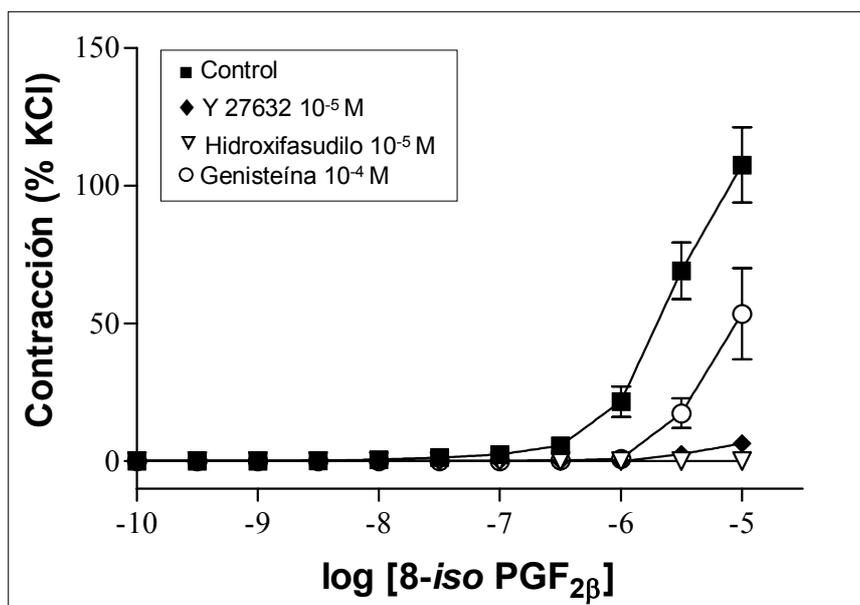


Figura 58. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2β} en lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵ M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵ M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴ M). Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 experimentos.

8-iso PGF _{2β}	Control	Y27632	Hidroxifasudil	Genisteína
Emax	95,07 ±15,46	6,48 ±2,26	33,73 ±7,57	67,72 ±26,58
pD₂	-5,69 ±0,06	-5,47 ±0,05	-6,43 ±5,26	-5,43 ±0,02
-log EC_{K10}	-6,18 ±0,15	-4,95 ±0,16	-6,67 ±1,49	-5,61 ±0,31
-log EC_{K30}	-5,66 ±0,21	-3,04 ±0,42	-5,46 ±0,42	-4,70 ±0,77

Tabla 24. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10⁻⁵ M) e hidroxifasudilo (10⁻⁵ M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10⁻⁴ M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

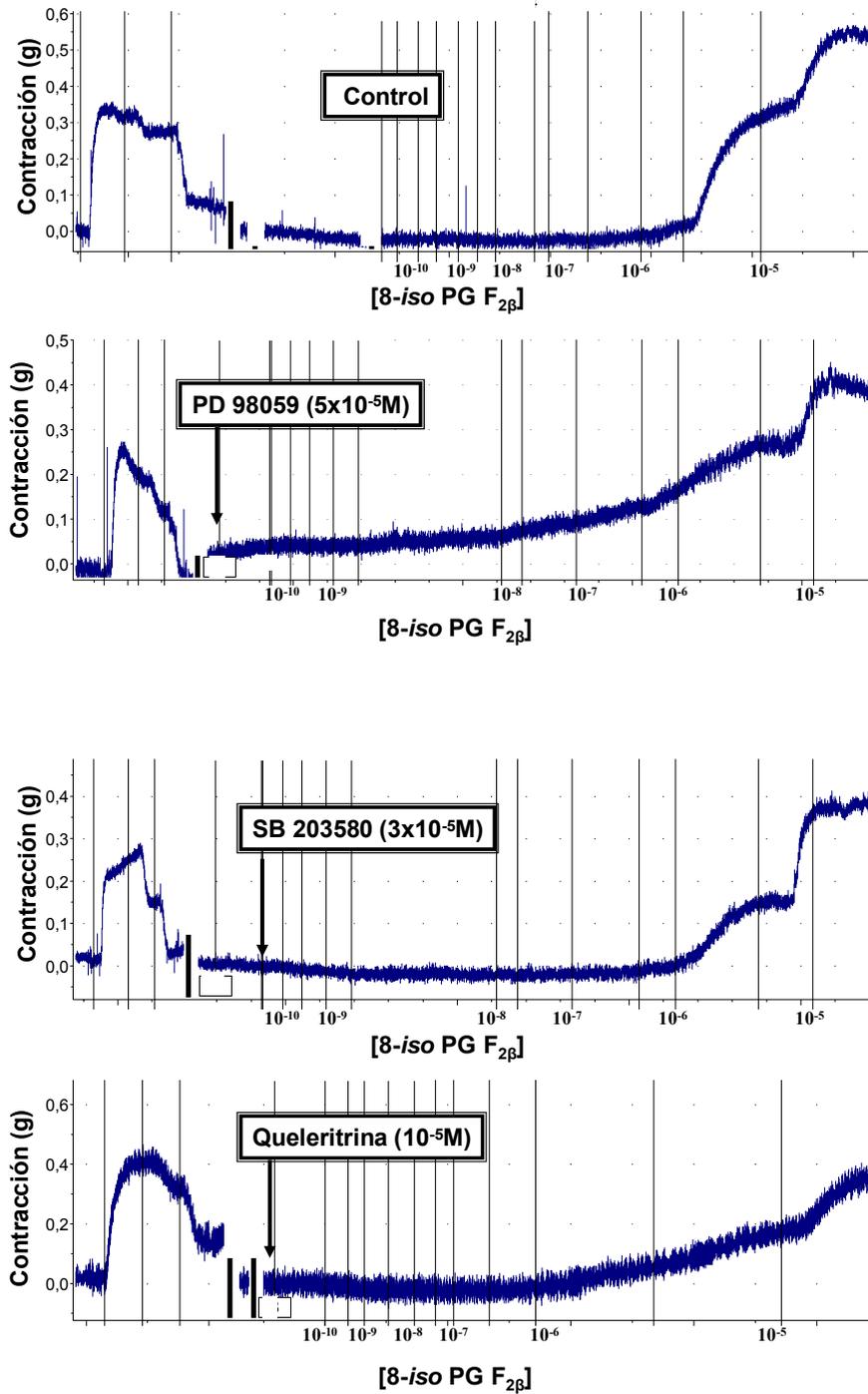


Figura 59. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGF_{2β} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que no se modifica dicha dicha contracción.

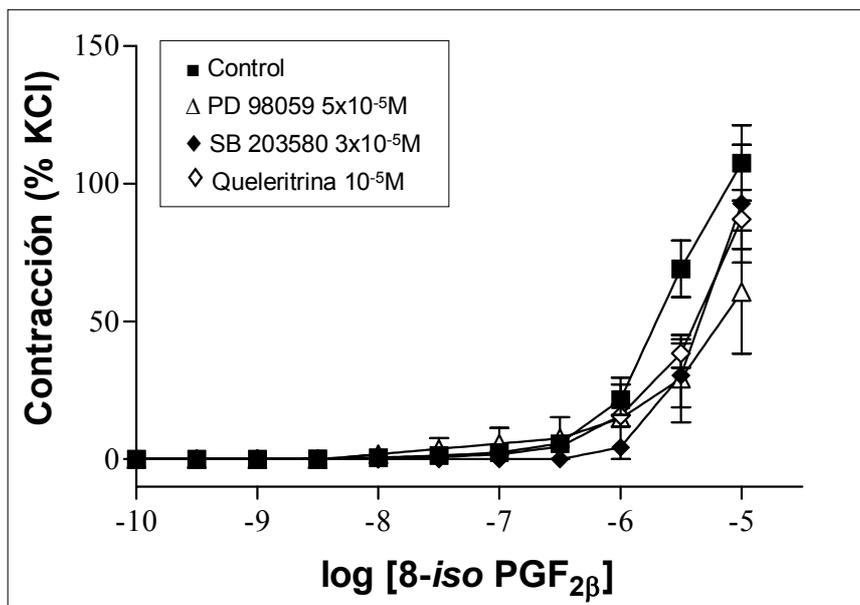


Figura 60. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de la MAP, PD 98059 (5×10^{-5} M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Cada punto representa la media \pm eem de 5-7 experimentos.

8-iso PGF_{2β}	Control	PD 98059	SB 203580	Queleritrina
E_{max}	95,07 $\pm 15,46$	60,67 $\pm 22,29$	92,81 21,40	72,36 $\pm 13,74$
pD₂	-5,69 $\pm 0,06$	-5,54 $\pm 0,09$	-5,45 0,02	-5,61 $\pm 0,08$
-log EC_{K10}	-6,18 $\pm 0,15$	-6,16 $\pm 0,47$	-5,90 0,11	-6,00 $\pm 0,15$
-log EC_{K30}	-5,66 $\pm 0,21$	-5,43 $\pm 0,41$	-5,55 $\pm 0,15$	-5,23 $\pm 0,46$

Tabla 25. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

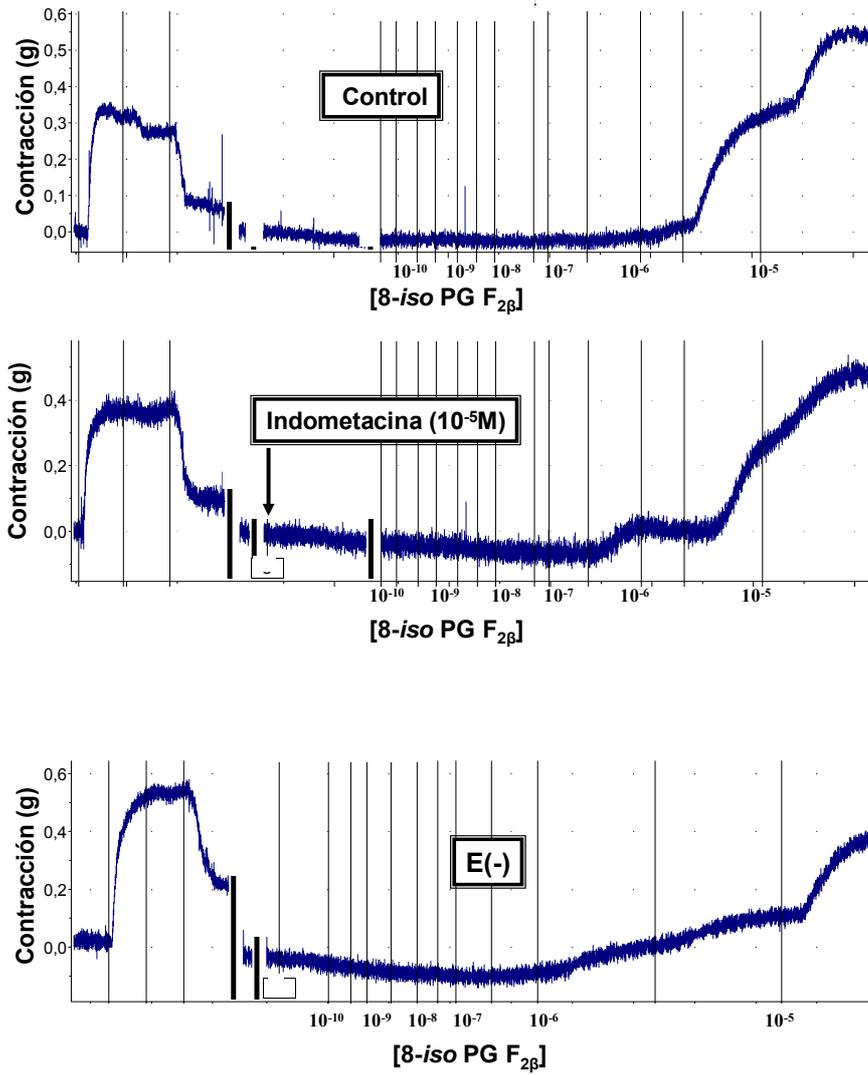


Figura 61. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGF_{2β} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados en ausencia y en presencia de indometacina y tras eliminación del endotelio.

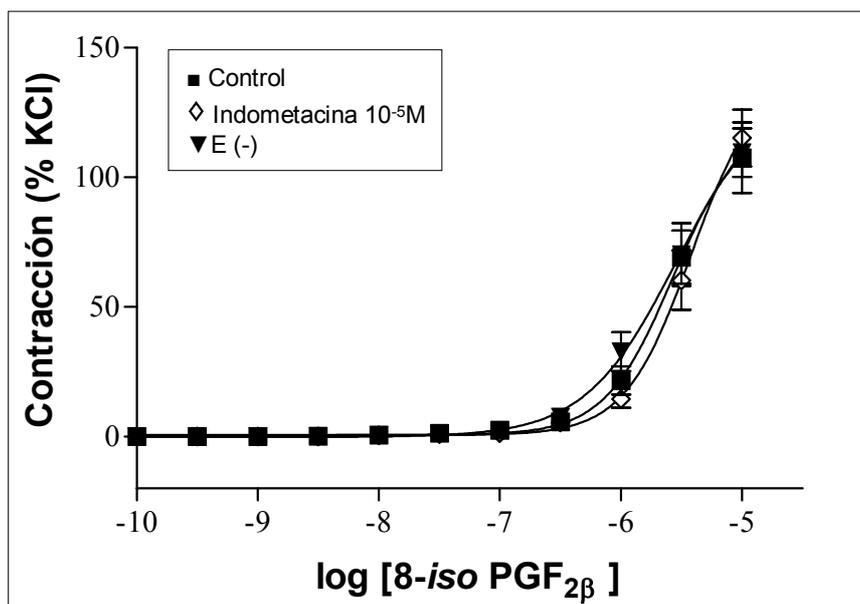


Figura 62. Curvas de concentración-respuesta para 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio. Cada punto representa la media ± eem de 6 experimentos.

8-iso PGF_{2β}	Control	Indometacina	E (-)
Emax	95,07 ±15,46	131,04 ±15,27	120,91 ±13,89
pD₂	-5,69 ±0,06	-5,56 ±0,05	-5,75 ±0,08
-log EC_{K10}	-6,18 ±0,15	-6,09 ±0,17	-6,55 ±0,05
-log EC_{K30}	-5,66 ±0,21	-5,95 ±0,09	-6,10 ±0,11

Tabla 26. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de 8-iso PGF_{2β} en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia del inhibidor de la COX, indometacina (10⁻⁵ M) y tras eliminación del endotelio. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

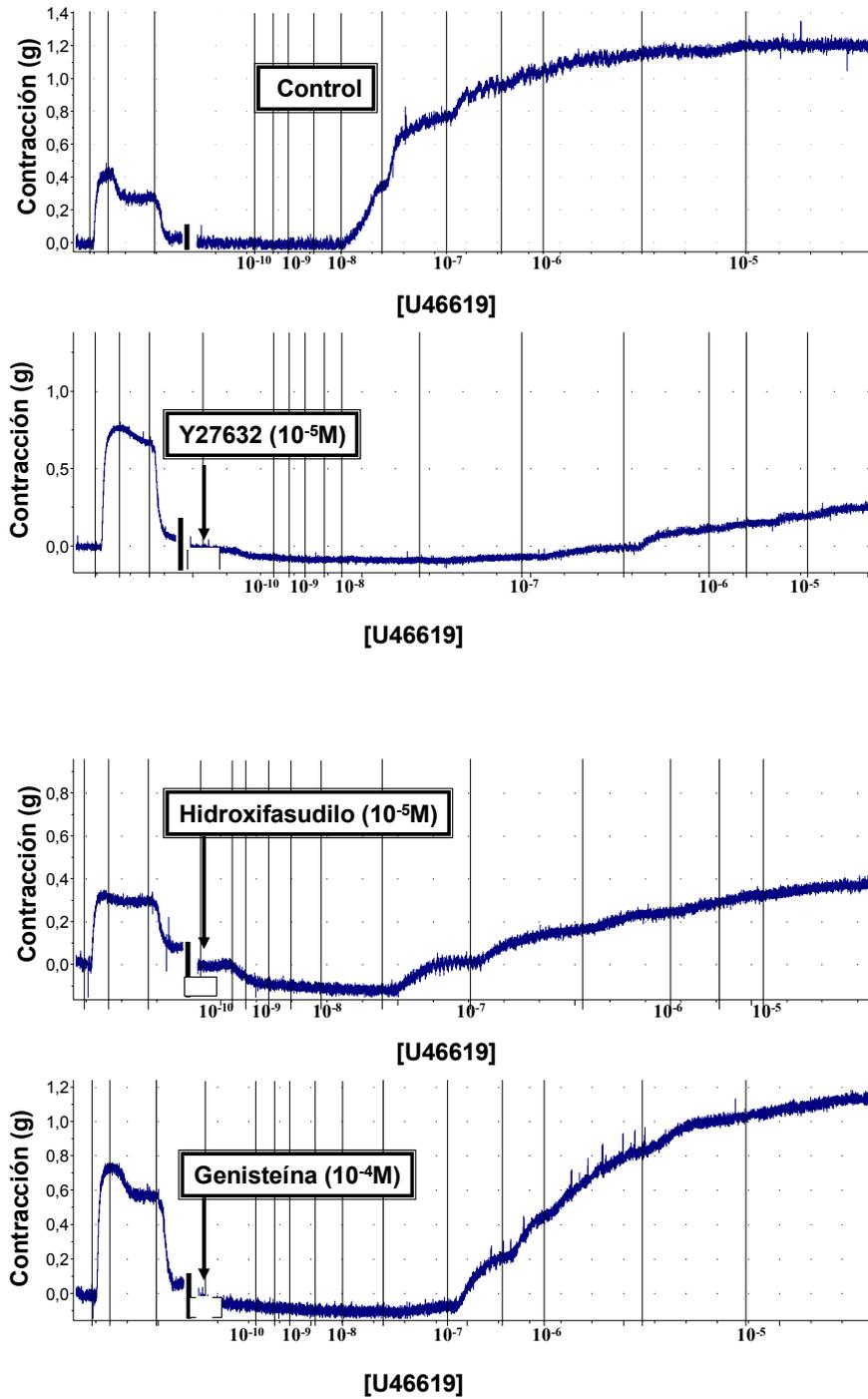


Figura 63. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por 8-*iso* PGF_{2β} en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que se consigue reducir dicha contracción.

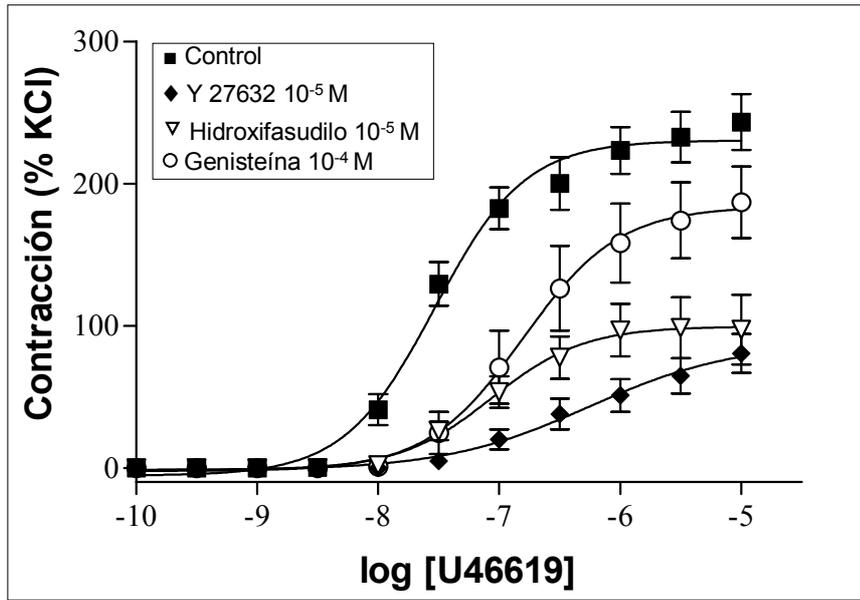


Figura 64. Curvas de concentración-respuesta para U46619 en lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10^{-5} M) e hidroxifasudilo (10^{-5} M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10^{-4} M). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 experimentos.

U46619	Control	Y27632	Hidroxifasudil	Genisteína
Emax	240,49 $\pm 18,47$	80,61 $\pm 13,66$	109,92 $\pm 17,42$	186,85 $\pm 25,23$
pD₂	-7,45 $\pm 0,08$	-6,31 $\pm 0,11$	-6,82 $\pm 0,14$	-6,68 $\pm 0,16$
-log EC_{K10}	-8,32 $\pm 0,05$	-7,24 $\pm 0,12$	-7,88 $\pm 0,10$	-7,70 $\pm 0,16$
-log EC_{K30}	-8,17 $\pm 0,06$	-6,44 $\pm 0,24$	-7,11 $\pm 0,36$	-7,34 $\pm 0,21$

Tabla 27. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (Emax) y pD₂ respectivamente) de U46619 en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de Rho cinasa, Y27632 (10^{-5} M) e hidroxifasudilo (10^{-5} M) y del inhibidor de la tirosina cinasa, genisteína (10^{-4} M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

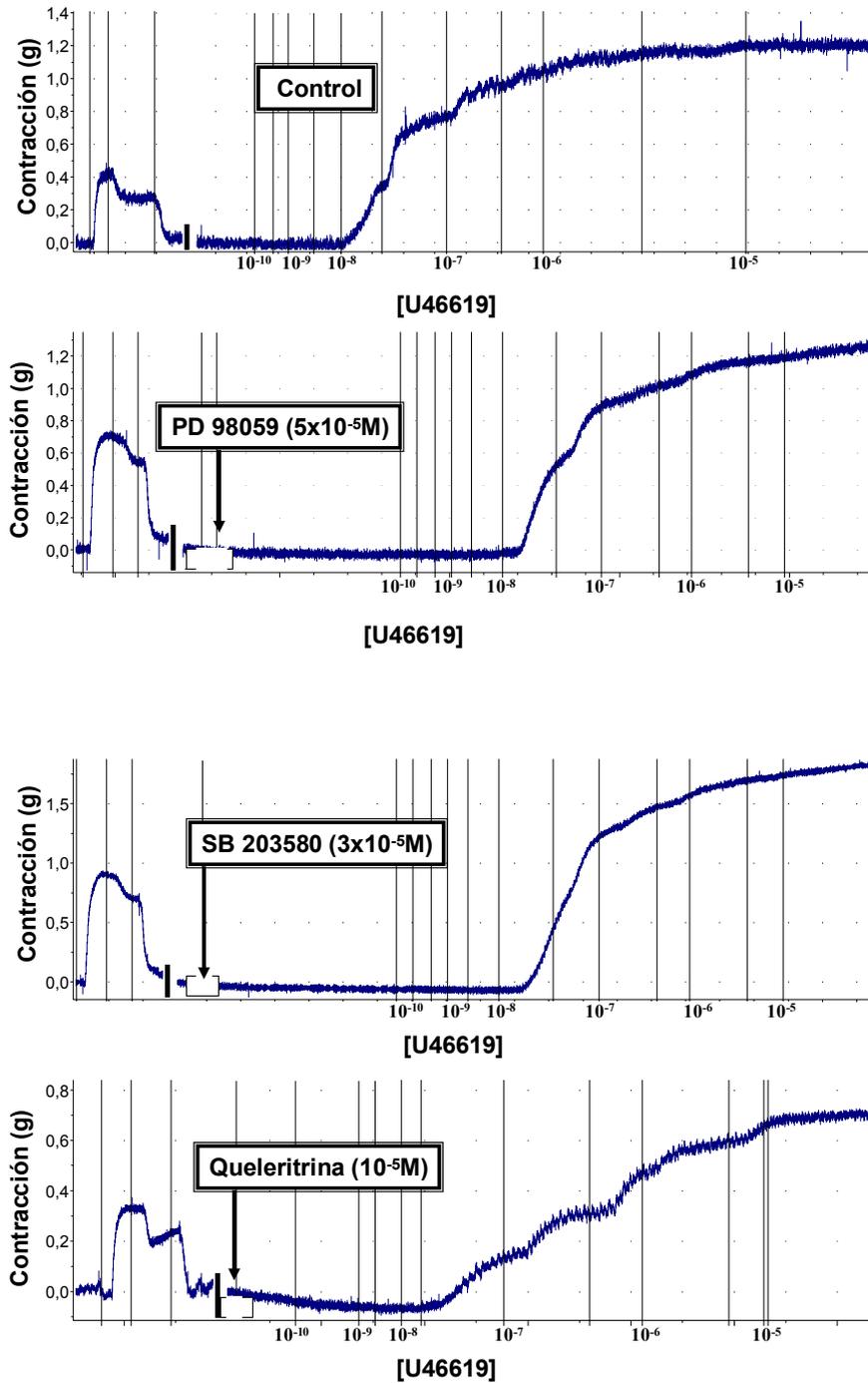


Figura 65. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por U46619 en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados tanto en ausencia (control) como en presencia de varios antagonistas de cinasas con los que no se modifica dicha dicha contracción.

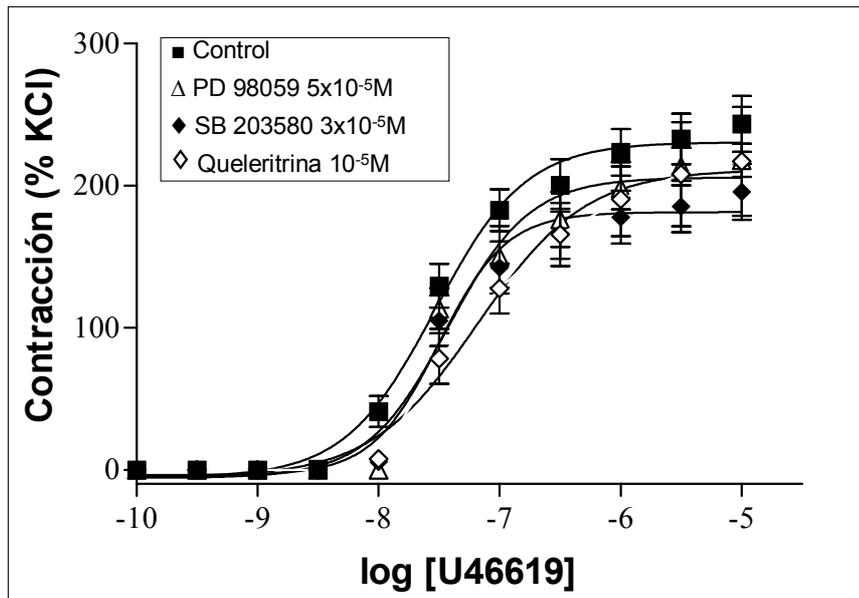


Figura 66. Curvas de concentración-respuesta para U46619 en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) de inhibidores de la MAP, PD 98059 (5×10^{-5} M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Cada punto representa la media \pm eem de 5-7 experimentos.

U46619	Control	PD 98059	SB 203580	Queleritrina
E_{max}	240,49 $\pm 18,47$	217,64 $\pm 11,61$	195,39 $\pm 19,62$	209,22 $\pm 31,00$
pD₂	-7,45 $\pm 0,08$	-7,26 $\pm 0,13$	-7,40 $\pm 0,04$	-7,16 $\pm 0,10$
-log EC_{K10}	-8,32 $\pm 0,05$	-8,12 $\pm 0,06$	-8,20 $\pm 0,02$	-8,13 $\pm 0,08$
-log EC_{K30}	-8,17 $\pm 0,06$	-7,94 $\pm 0,10$	-8,02 $\pm 0,05$	-7,86 $\pm 0,11$

Tabla 28. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de U46619 en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia de inhibidores de la MAP, PD 98059 (5×10^{-5} M); del inhibidor de la P-38 cinasa, SB 203580 (3×10^{-5} M) y del inhibidor de la cinasa de la protenina C, queleritrina (10^{-5} M). Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

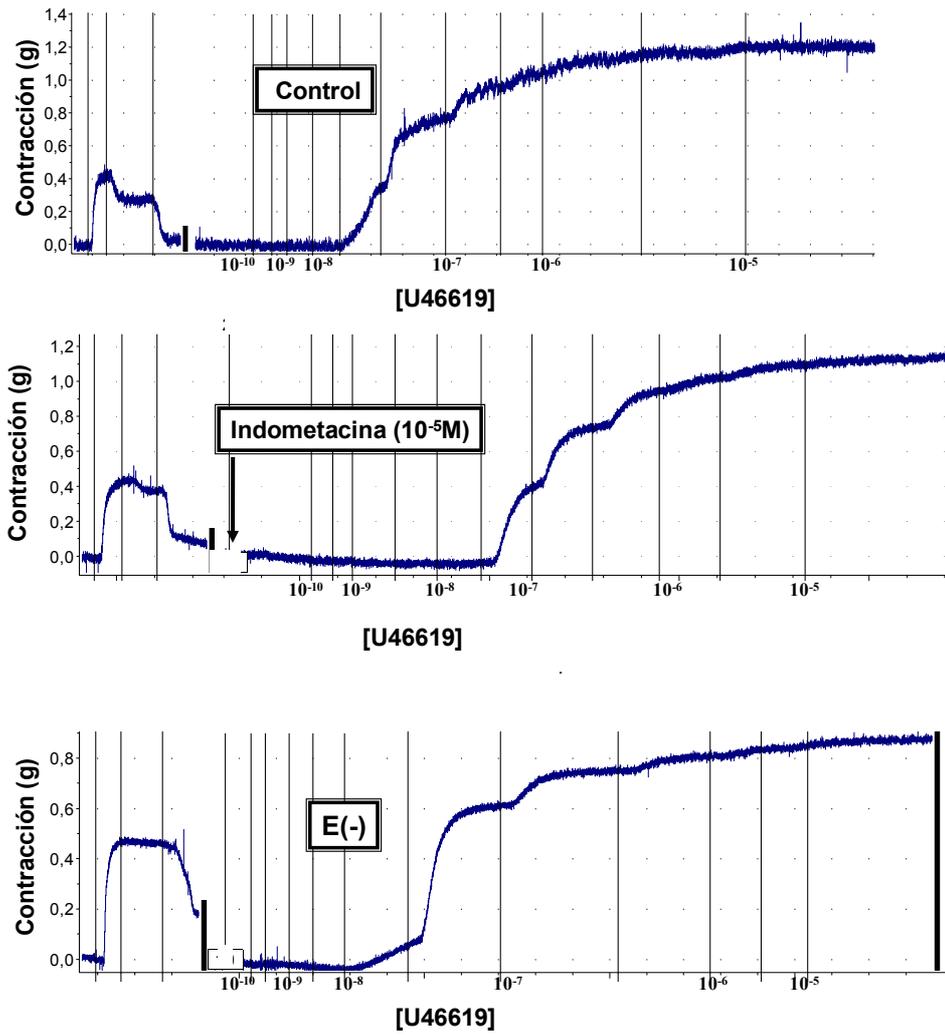


Figura 67. Registro original correspondiente a ejemplos de contracción mediada por U46619 en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. Experimentos realizados en ausencia y en presencia de indometacina y tras eliminación del endotelio.

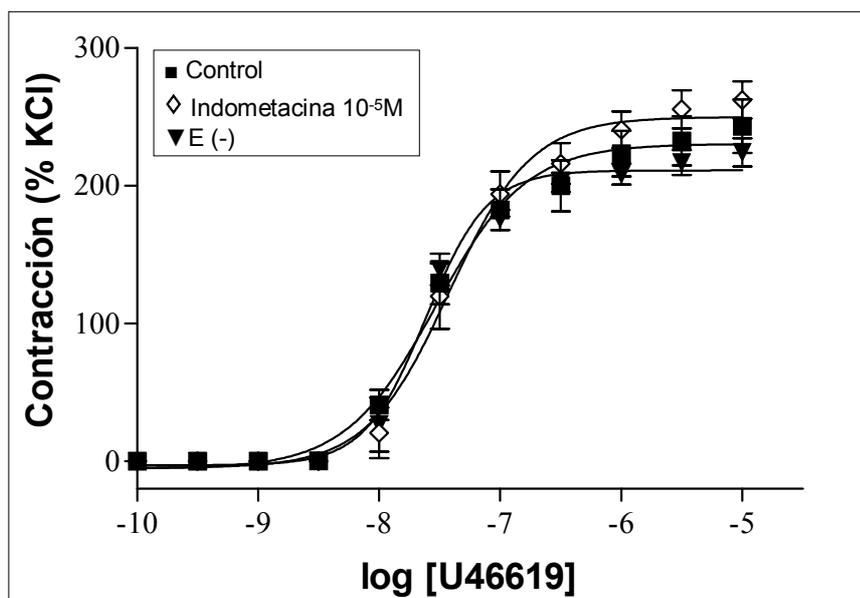


Figura 68. Curvas de concentración-respuesta para U46619 en arteria pulmonar lechones de 2 semanas, tanto en presencia como en ausencia (control) del inhibidor de la COX, indometacina (10^{-5} M) y tras eliminación del endotelio. Cada punto representa la media \pm eem de 6 experimentos.

U46619	Control	Indometacina	E (-)
E_{max}	240,49 $\pm 18,47$	262,38 $\pm 13,35$	220,21 $\pm 8,94$
pD₂	-7,45 $\pm 0,08$	-7,37 $\pm 0,12$	-7,59 $\pm 0,12$
-log EC_{K10}	-8,32 $\pm 0,05$	-8,26 $\pm 0,09$	-8,38 $\pm 0,12$
-log EC_{K30}	-8,17 $\pm 0,06$	-8,09 $\pm 0,10$	-8,21 $\pm 0,11$

Tabla 29. Parámetros extraídos de las curvas de concentración-respuesta que reflejan la eficacia y la potencia (Efecto máximo (E_{max}) y pD₂ respectivamente) de U46619 en arteria pulmonar del lechón de dos semanas, tanto en ausencia (control) como en presencia del inhibidor de la COX, indometacina (10^{-5} M) y tras eliminación del endotelio. Se indican de igual forma los -log EC_{K10} y -log EC_{K30}.

Relajación ...

2. Relajación

2.1 Estudio de la relajación mediada por isoprostanos

De los isoprostanos estudiados, sólo la 8-*iso* PGE₂ (10⁻⁹-10⁻⁵M) produjo una discreta relajación (relajación máxima de 60,1±8,7%) en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas precontraídas con U46619 (10⁻⁷M) (**Figura 69**). Cuando la precontracción de la arteria se llevó a cabo con ET-1, no se observaron los efectos relajantes de la 8-*iso* PGE₂, pero sí cuando la contracción mediada por ET-1 se hizo en presencia del antagonista del receptor TP SQ 29,548 (10⁻⁸M). En este caso, la relajación observada resultó ser menor (21,3±9,23%) que la de los vasos precontraídos con U46619 (**Figura 69**). Los efectos relajantes de 8-*iso* PGE₂ no se objetivaron ni en venas pulmonares, ni en arterias mesentéricas del lechón de 2 semanas ni en arterias pulmonares del lechón recién nacido. El resto de los isoprostanos resultaron ser inefectivos como vasodilatadores en el lecho vascular pulmonar y mesentérico.

En arterias coronarias precontraídas con U46619 (10⁻⁷M), la 8-*iso* PGE₂ desarrolló la respuesta vasodilatadora más potente (relajación máxima 29,55±7,88%), aunque también se observaron respuestas relajantes debidas a 8-*iso* PGE₁ y 8-*iso* PGF_{2α}. (**Figura 70**)

Los agonistas del receptor EP estudiados (Misoprostol, PGE₁, PGE₂), desencadenaron una relajación completa en las arterias pulmonares precontraídas con U46619 (10⁻⁷M) (**Figura 71**). Sin embargo, no se observó relajación en respuesta al agonista del receptor DP -PGD₂- o al agonista del receptor IP -iloprost- (**Figura 72**).

2.2 Mecanismos de transducción de la respuesta relajante inducida por isoprostanos

La relajación en arterias pulmonares en lechones de 2 semanas mediada por la 8-*iso* PGE₂ se redujo en presencia de los inhibidores de la óxido nítrico sintetasa -L-NAME; 10⁻⁴M- y del inhibidor de la guanilato ciclasa soluble -ODQ; 10⁻⁵M-. (**Figuras 73 y 74**).

En presencia del inhibidor de la COX -indometacina (10⁻⁵M)- se observó una tendencia a la reducción de la relajación mediada por la 8-*iso* PGE₂ que sin embargo, no alcanzó niveles significativos (**Figuras 75**).

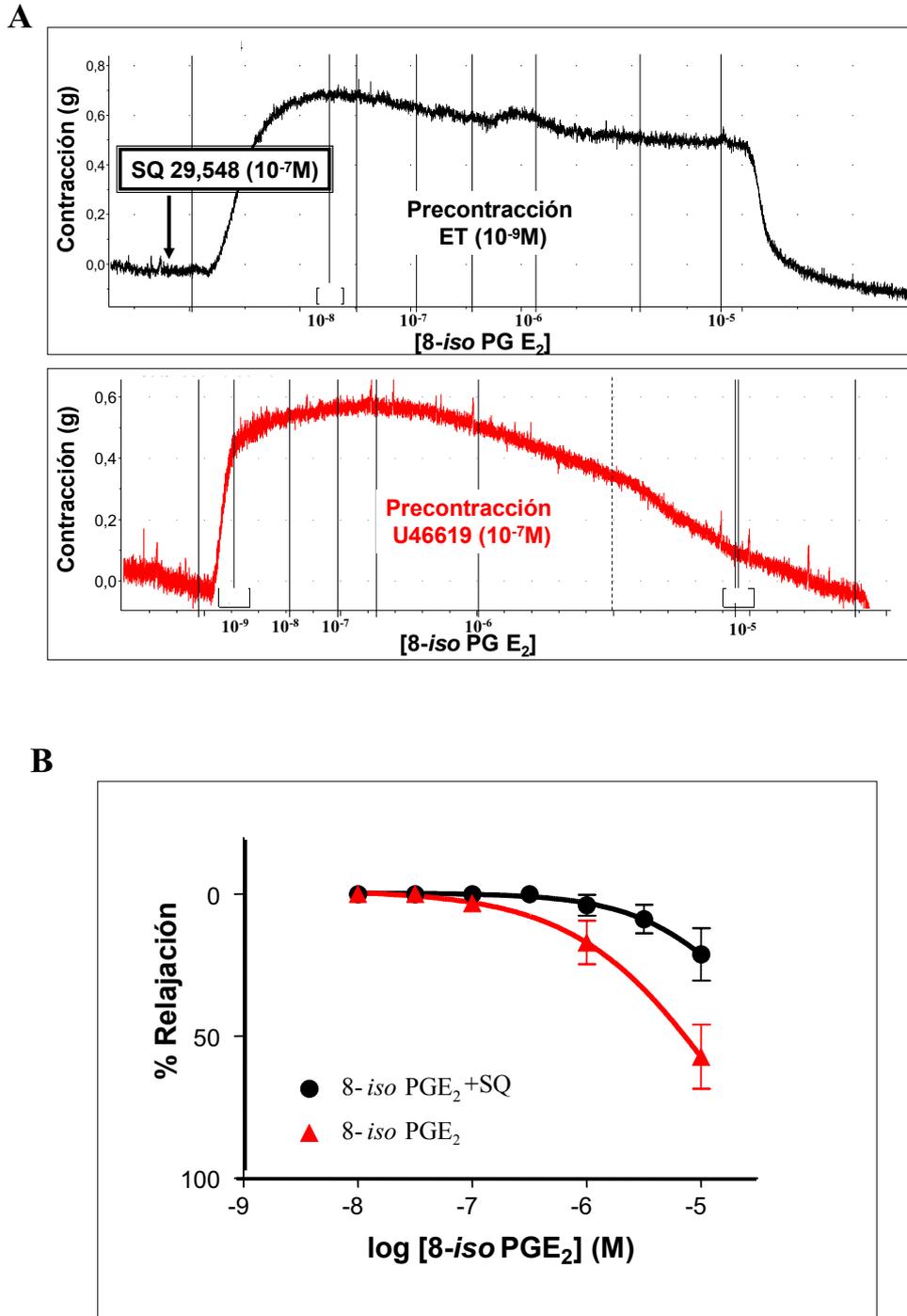


Figura 69. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M) –curva roja- o con ET-1 (10⁻⁹M) en presencia de SQ 29,548 (10⁻⁷M) –curva negra-. Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± error estándar de la media (e.e.m.) 6-13 experimentos.

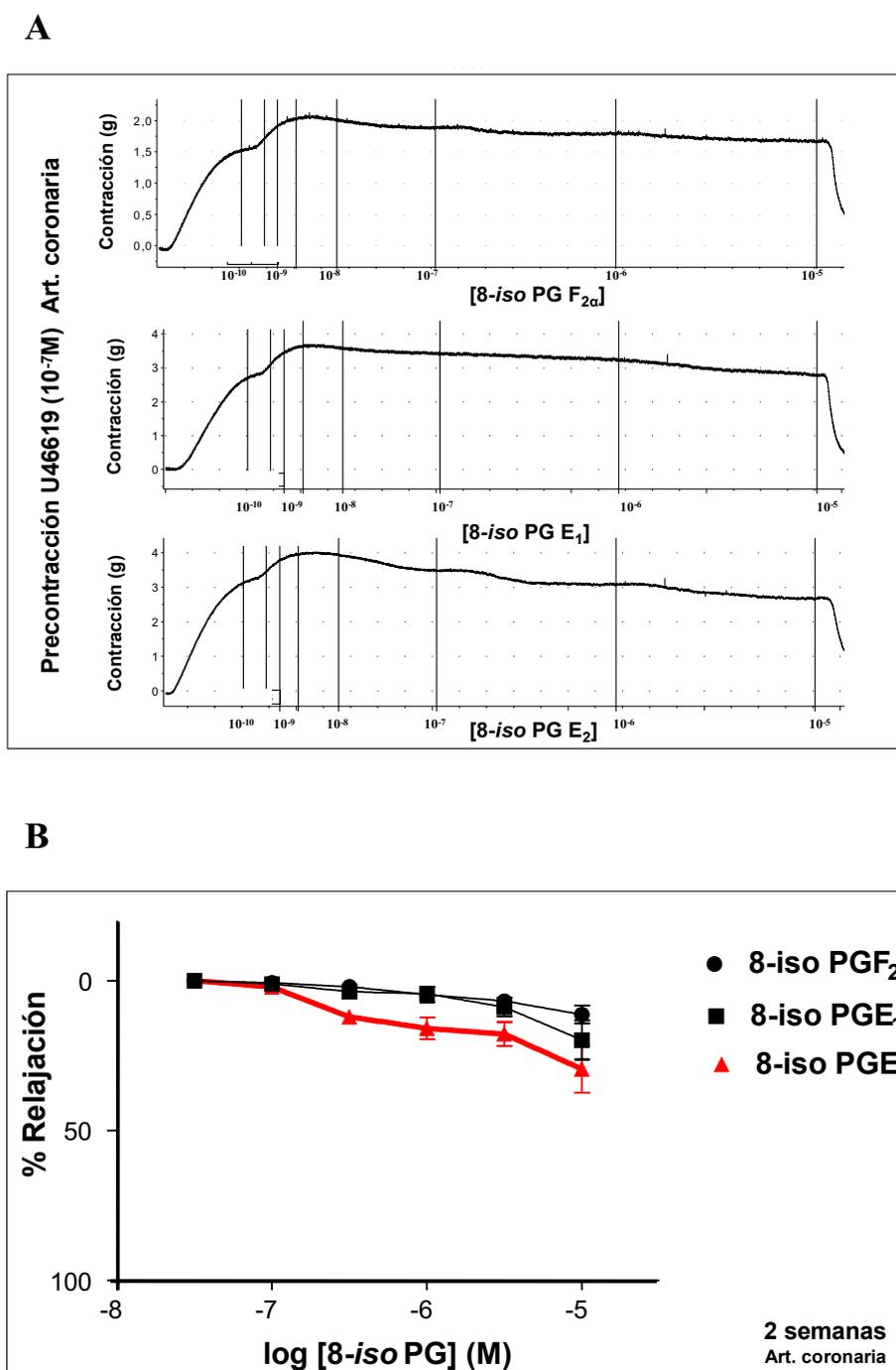
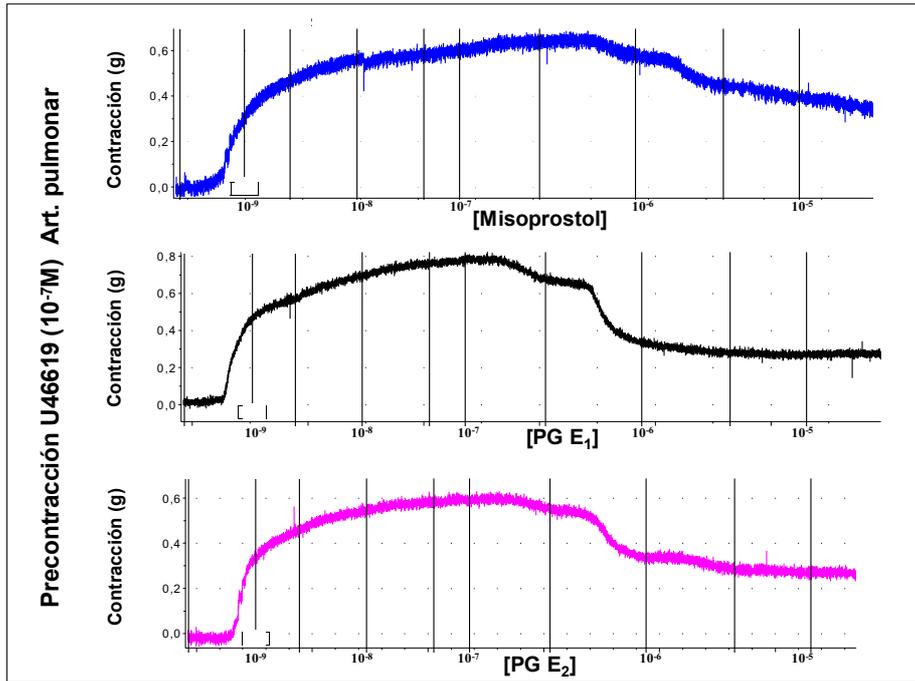


Figura 70. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGE₁ y 8-iso PGE₂ en arteria coronaria de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGF_{2α}, 8-iso PGE₁ y 8-iso PGE₂ en la solución nutricia tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 experimentos.

A



B

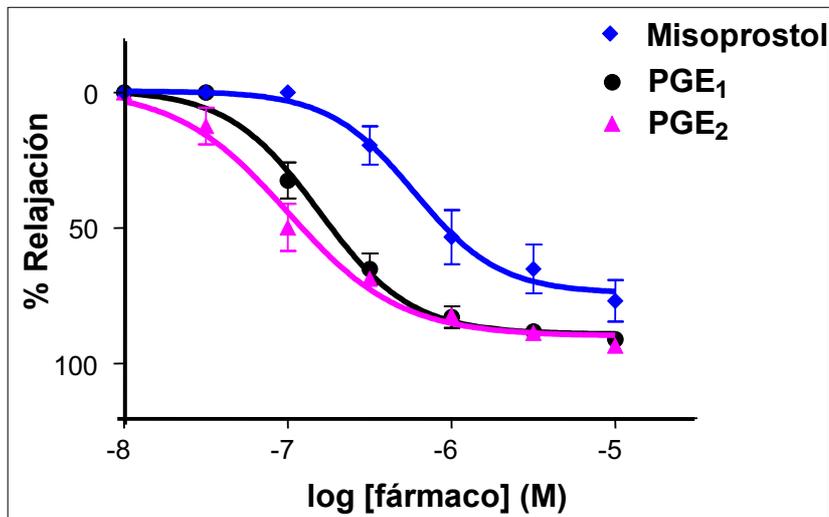


Figura 71. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por varios prostanoideos en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de agonistas del receptor EP (Misoprostol, PGE₁ y PGE₂) en la solución nutritiva tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6-9 experimentos.

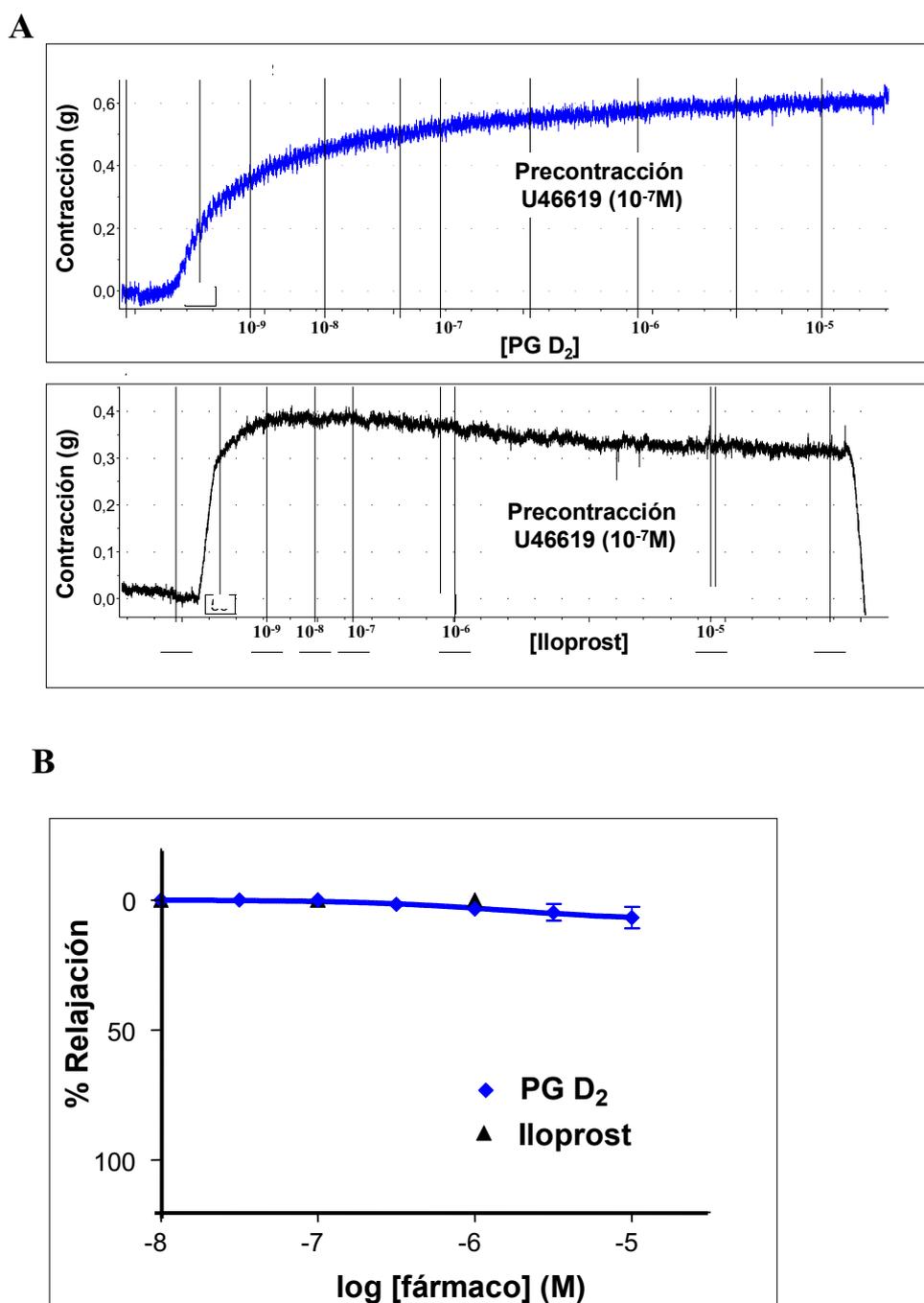


Figura 72. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por varios prostanoides en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración del agonista del receptor DP (PGD₂) y del receptor IP (Iloprost) en la solución nutricia tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M). Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 5-10 experimentos.

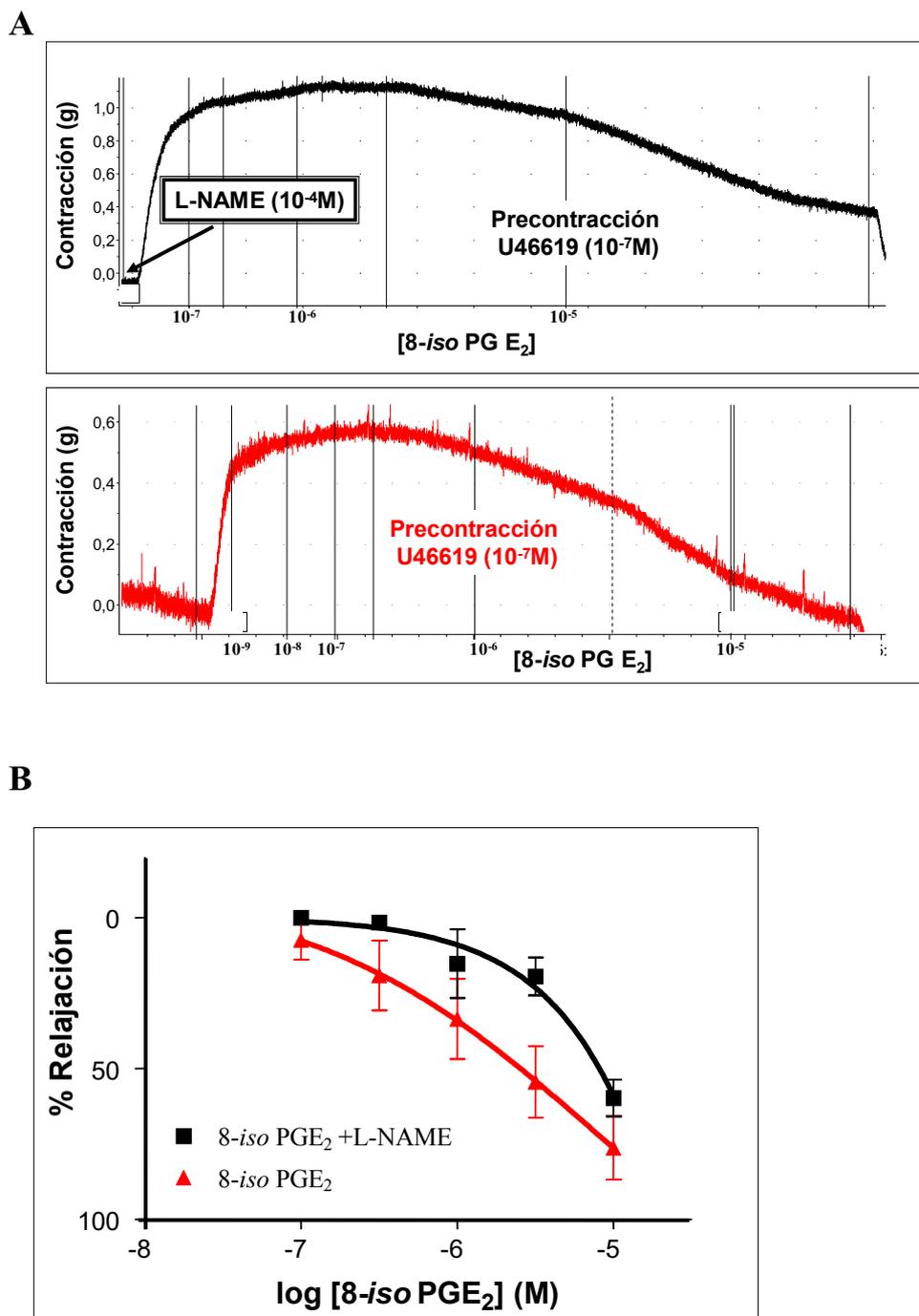


Figura 73. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M), tanto en ausencia –curva roja– como en presencia del inhibidor de la NOSe, L-NAME (10⁻⁴M) –curva negra–. Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 4-13 experimentos.

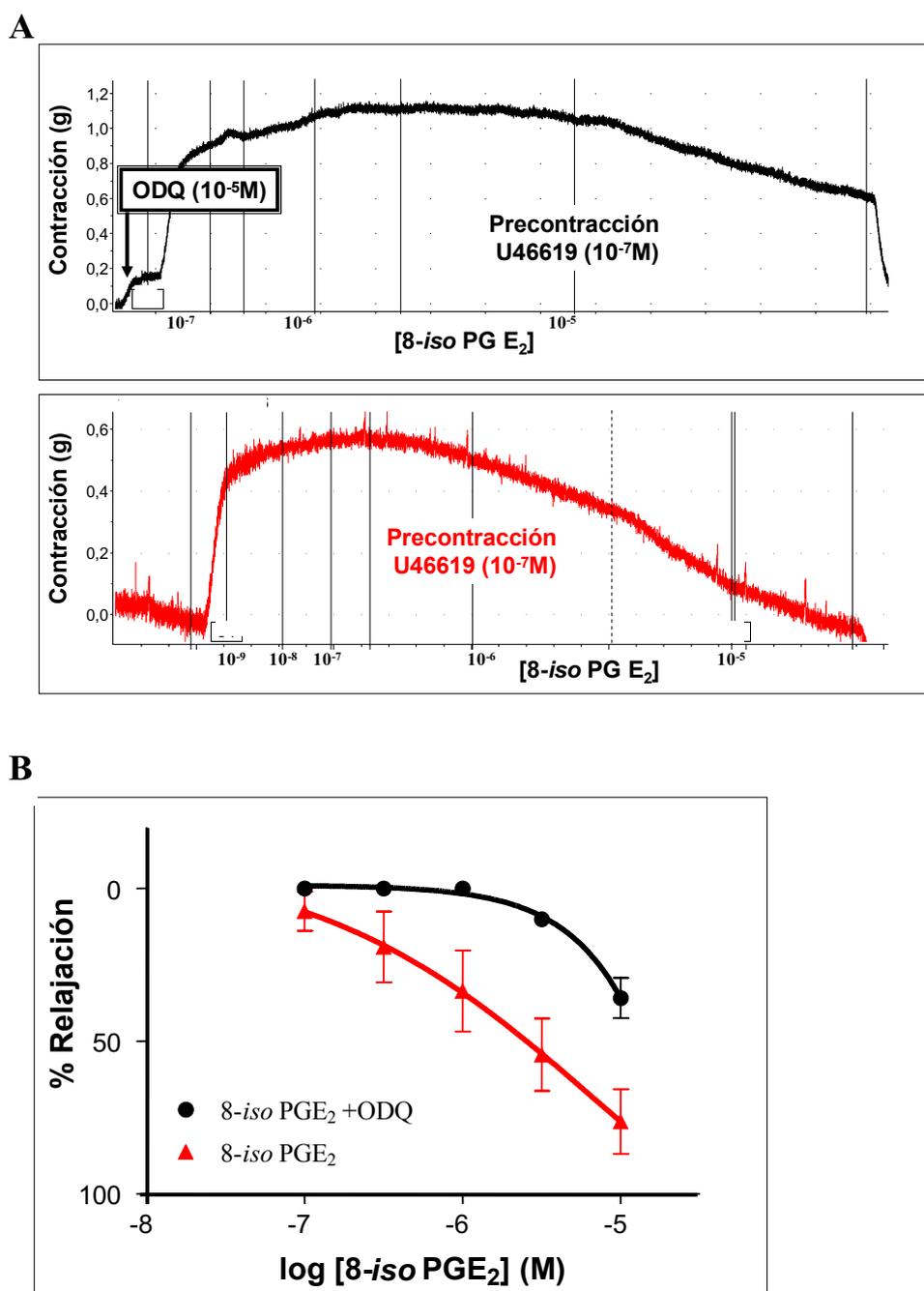
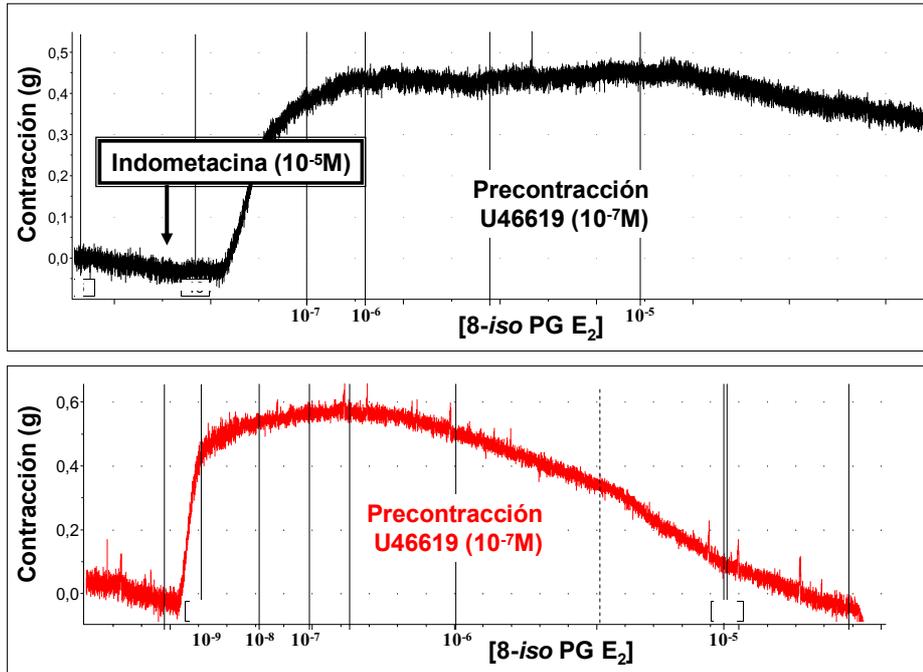


Figura 74. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M), tanto en ausencia –curva roja– como en presencia del inhibidor de la GCs, ODQ (10⁻⁵M) –curva negra–. Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. 4-13 experimentos.

A



B

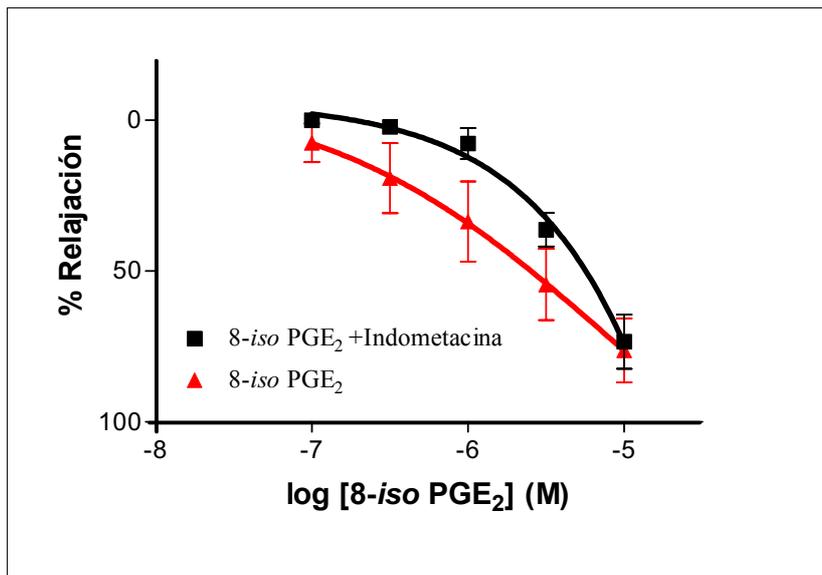


Figura 75. (A) Registro original correspondiente a ejemplos de relajación mediada por 8-iso PGE₂ en arteria pulmonar de lechones de 2 semanas. (B) Curva relajación-respuesta obtenida incrementando de forma acumulativa la concentración de 8-iso PGE₂ en la solución nutritiva tras precontracción del vaso con U46619 (10⁻⁷M), tanto en ausencia –curva roja– como en presencia del inhibidor de la COX, Indometacina (10⁻⁵M) –curva negra–. Las respuestas se expresan como un porcentaje de relajación respecto a la precontracción máxima obtenida en cada anillo vascular al principio del experimento. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 4-13 experimentos.

Discusión

E. DISCUSIÓN:

1. Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias pulmonares
2. Efectos contráctiles de los isoprostanos en venas pulmonares
3. Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias mesentéricas
4. Isoprostanos y relajación

Los isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas que se forman mediante la peroxidación –catalizada por radicales libres- del ácido araquidónico, en una reacción independiente de la COX (*Roberts y Morrow 1997; Janssen, 2001; Pratico y cols., 2001*). Los isoprostanos son usados clínica y experimentalmente como marcadores de muchas enfermedades en las cuales el estrés oxidativo juega un papel relevante, tales como el asma, la isquemia miocárdica, arteriosclerosis, hipercolesterolemia e hipertensión pulmonar (*Baraldi y cols., 2003; Cracowski y cols., 2001; Crankshaw y cols., 2003*). Sin embargo, en los últimos tiempos, se ha comenzado a acumular evidencia sobre el papel de los isoprostanos, no sólo como marcadores sino como agentes biológicos con actividad específica en diversos sistemas, incluyendo el vascular.

En la presente tesis doctoral hemos examinado los efectos de diversos isoprostanos sobre vasos pulmonares, mesentéricos y coronarios de lechones recién nacidos y de 2 semanas de vida. Hemos observado que tanto los isoprostanos que contenían en su estructura el anillo E (8-*iso* PGE₁ y 8-*iso* PGE₂) como el F (8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β}, 8-*iso* PGF_{2α} y 8-*iso* PGF_{2β}), modifican el tono del músculo liso vascular, produciendo en general un aumento del tono contráctil. La intensidad de la contracción es variable según el isoprostano, el vaso y la edad postnatal. Así pues, comprobamos que, en general, la contracción mediada por los isoprostanos fue mayor en vasos de recién nacido que en animales de dos semanas.

Debe ser resaltado que los efectos contráctiles que hemos observado para la mayoría de los isoprostanos, ocurren a concentraciones elevadas –en el rango micromolar- de

estos compuestos. Este hecho podría hacer dudar de un verdadero papel de los isoprostanos en el control del tono vascular. Sin embargo, se ha demostrado la acumulación de concentraciones localmente altas de isoprostanos en situaciones clínicas de daño oxidativo (*Patrono y FitzGerald, 1997; Kinsella, 2001*).

1 Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias pulmonares

Durante el proceso de transición desde la vida fetal a la postnatal, se llevan a cabo cambios importantes en la circulación pulmonar. En los primeros minutos de vida tiene lugar una reducción marcada de las resistencias vasculares pulmonares, en el momento en el que el pulmón sustituye a la placenta como órgano respiratorio. Posteriormente, estas resistencias continúan disminuyendo en un período de tiempo que se puede alargar hasta varias semanas (*Haworth y Hislop, 1981*). Si en la primera fase de reducción brusca de las resistencias vasculares pulmonares, determinados mediadores vasoactivos -tales como el NO y las prostaciclina- desempeñan un papel relevante, también durante la segunda fase de descenso más gradual de la RVP se han apreciado importantes cambios con la edad en las respuestas vasculares pulmonares a éstos y otros mediadores (*Villamor y cols., 2000; 2003; Pérez-Vizcaíno y cols., 2002*). En la presente tesis doctoral, hemos observado que varios de los isoprostanos (8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{1β} y 8-*iso* PGF_{2β}), produjeron mayores contracciones en los vasos pulmonares neonatales que en los de dos semanas. Sin embargo, no observamos cambios con la edad en la respuesta de estos vasos al U46619.

En un estudio previo en lechones de dos semanas, *Truog y cols. (1997)* observaron que la 8-*iso* PGF_{2α}, produjo una marcada vasoconstricción pulmonar mediada por la estimulación del receptor TP. Sin embargo, al compararlo con el U46619, la 8-*iso* PGF_{2α} fue menos potente en aproximadamente un orden de magnitud. Las respuestas de los isoprostanos en arterias y venas pulmonares en cerdo adulto, han sido descritas previamente por *Janssen y Tazzeo (2002)* y *Tazzeo y cols. (2003)*. Entre los isoprostanos que estudiaron (8-*iso* PGE₁, 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{1α}, 8-*iso* PGF_{2α}, y 8-*iso*

PGF_{2β}), la 8-*iso* PGE₂ resultó ser el más potente y eficaz en arterias y venas pulmonares. Las contracciones máximas desarrolladas por los isoprostanos en vasos pulmonares en adultos fueron del orden del 50 al 90% de la respuesta a KCl (60 mM), mientras que en nuestro estudio, las producidas en lechones recién nacidos y de 2 semanas de vida alcanzaron valores del orden de 150 a 200% de la respuesta a KCl. Por lo tanto, el descenso con la edad en la contracción mediada por isoprostanos que encontramos en animales de 2 semanas comparados con los recién nacidos, parece continuarse durante la vida adulta.

Otro hecho interesante a comentar es que algunos de los isoprostanos con anillo F, como 8-*iso* PGF_{2α} y 8-*iso* PGF_{2β} desarrollaron, en nuestros experimentos, contracciones comparables a las de los isoprostanos con anillo E. Por el contrario, en vasos pulmonares de cerdos adultos, los isoprostanos con anillo F, produjeron una contracción bastante menor que los del anillo E (*Janssen y Tazzeo, 2002; Tazzeo y cols., 2003*). Ya hemos comentado previamente las diferencias estructurales mínimas existentes entre los isoprostanos y sus isómeros las prostaglandinas. Morrow y Roberts (1997) propusieron que la posición de las cadenas laterales de los isoprostanos, podría ser la responsable de los efectos vasoconstrictores de los mismos. Sametz y cols. (2000) comprobaron que el número de dobles enlaces junto con la orientación cis de las cadenas laterales, juega un papel importante en la vasoconstricción mediada por los isoprostanos. El hecho de tener el anillo orientado en posición cis en lugar de trans, hace que la molécula sea plana y de superficie rugosa a diferencia de los prostanoïdes, que son moléculas de bordes afilados y en forma de punta de flecha. Este aspecto podría influir sobre su mecanismo de acción a través de un determinado receptor. Al igual que otros autores (*Janssen y cols., 2001b, Janssen y Tazzeo, 2002; Tazzeo y cols., 2003*), nosotros encontramos también diferencias en la respuesta vascular a isoprostanos con estructura prácticamente idéntica. Así pues, la 8-*iso* PGE₁ resultó ser menos potente tanto en arterias como en venas que la 8-*iso* PGE₂ y los efectos relajantes a altas concentraciones se observaron sólo en el caso de 8-*iso* PGE₂. Además, vimos que 8-*iso* PGF_{2α}, la cual difiere únicamente en tener un doble enlace más que la 8-*iso* PGF_{1α}, produce una contracción mucho mayor que éste. Se ha sugerido la existencia de receptores muy específicos para los isoprostanos para explicar estas marcadas diferencias en actividad a pesar de la similitud en estructura. Sin embargo, al igual que otros muchos autores, nosotros hemos

observado que la contracción mediada por los isoprostanos es altamente sensible al antagonista del receptor TP, SQ 29,548 (*Janssen y cols., 2001, Janssen y Tazzeo 2002; Tazzeo y cols., 2003*). No obstante, Janssen y Tazzeo (2002), observaron en arterias y venas pulmonares adultas porcinas, que mientras las contracciones producidas por 8-iso PGE₁, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β} fueron abolidas mediante el bloqueo del receptor TP, la 8-iso PGE₂ fue capaz de producir una contracción sustancial en venas pulmonares en presencia de antagonistas del receptor TP. Sus datos sugieren que, al menos en este vaso, la 8-iso PGE₂ pudiera actuar mediante la estimulación del receptor EP₃ o de un receptor específico para los isoprostanos. Sin embargo, nosotros hemos observado que las contracciones mediadas por 8-iso PGE₂, tanto en arterias como en venas pulmonares y arterias mesentéricas, fueron igualmente sensibles al antagonista del receptor TP, SQ 29,548.

La 8-iso PGF_{2α} ha sido el isoprostano más ampliamente estudiado hasta el momento. De hecho, el único trabajo que ha evaluado los cambios relacionados con la edad en las acciones vasculares de los isoprostanos, describe los efectos de este compuesto en arterias pulmonares intralobares de ratas de 1 y 2 semanas de vida, comparadas con ratas adultas (*Belik y cols., 2003*). Belik y cols. (2003), demostraron que la contracción de la arteria pulmonar de la rata en respuesta a 8-iso PGF_{2α} aumentaba con la edad postnatal. Sin embargo, estos autores describen también un aumento con la edad en la respuesta contráctil al U46619, que como ya hemos referido no ha sido apreciado por nosotros en el presente trabajo. Por tanto, el aumento con la edad en la respuesta a 8-iso PGE₂ en la arteria pulmonar de rata, parece reflejar un aumento en la capacidad contráctil de este tejido en respuesta a diversos agonistas.

Mediante el empleo de diversas herramientas farmacológicas, quisimos caracterizar las diferentes vías de actuación para los isoprostanos. Así estudiamos -en diversas condiciones experimentales- las contracciones inducidas por la 8-iso PGE₂, la 8-iso PGF_{2α}, la 8-iso PGF_{2β} y U46619 en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas de vida. Ni la eliminación mecánica del endotelio, ni la inhibición de la COX con indometacina, ni la inhibición de la cinasa de la proteína C con queleritrina, modificaron de forma significativa la contracción mediada por los mencionados isoprostanos o por el U46619. Las vías de señalización que median la contracción inducida por el receptor TP

son objeto de controversia, ya que diversas cinasas de proteínas tales como la cinasa de la proteína C, la Rho cinasa y la tirosina cinasa, han sido implicadas (Cogolludo y cols., 2003; Pérez-Vizcaíno y cols., 2001; Janssen y cols., 2001). Recientemente se ha descrito que una isoforma atípica de la cinasa de la proteína C –PKC ζ – pudiera intervenir en la contracción inducida por el U46619 en la arteria pulmonar de rata (Cogolludo y cols., 2003). La queleritrina, el inhibidor por nosotros utilizado, podría actuar sólo débilmente sobre esta isoforma (Di Mari y cols., 2003), lo que justificaría la ausencia de efecto sobre la contracción mediada por U46619 en nuestros experimentos. Sin embargo, Cogolludo y cols., han demostrado muy recientemente que tanto la calfoestina C como el péptido pseudosustrato de PKC ζ –que son potentes inhibidores de PKC ζ – fueron también inefectivos en la vasoconstricción mediada por U46619 en arterias pulmonares de lechones de 2 semanas (Cogolludo y cols., 2005). No obstante, resulta muy interesante destacar que la contracción mediada por U46619 en las arterias pulmonares neonatales sí se redujo de modo significativo en presencia de los inhibidores de PKC ζ (Cogolludo y cols., 2005). Por tanto, y a pesar de que la vasoconstricción pulmonar inducida por TXA₂ es similar en lechones recién nacidos y a las dos semanas de edad, la vía de señalización parece variar con la edad, siendo la participación de la PKC ζ más importante en el recién nacido, mientras que parece aumentar de modo progresivo la participación de otras vías, como la sensibilización al calcio a través de Rho cinasa, en los primeros días de vida postnatal (Cogolludo y cols., 2005). Si estos cambios con la edad en la vía de señalización afectan no sólo a la contracción mediada por U46619, sino también a la mediada por isoprostanos es un hecho que requiere ser investigado en el futuro.

Al igual que lo observado tras la inhibición de la PKC con los inhibidores de la cinasa de la proteína activadora del mitógeno -PD 98059- o de la p38 cinasa -SB 203580-, no afectaron a la contracción mediada por 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{2 α} , 8-*iso* PGF_{2 β} o U46619 en arterias pulmonares de dos semanas. Sin embargo, el inhibidor no específico de la tirosina cinasa, genistéina, redujo marcadamente estas contracciones. Las cinasas de tirosina producen la activación de otras cinasas (Janssen y cols., 2001b). En nuestros experimentos, comprobamos que dos agentes altamente selectivos para Rho cinasa (Y 27632 e hidroxifasudilo) también inhibían las contracciones mediadas por los isoprostanos y por U46619. Por lo tanto, de nuestros resultados se deduce que los efectos contráctiles de 8-*iso* PGE₂, 8-*iso* PGF_{2 α} , 8-*iso* PGF_{2 β} y U46619 en arterias

pulmonares de lechones de dos semanas, estarían mediados a través del receptor TP acoplado a la tirosina cinasa(s) y a la Rho cinasa. Se han publicado vías de actuación similares de los isoprostanos en vasos pulmonares de diversas especies incluyendo la humana (*Janssen y cols., 2001*). Resulta interesante destacar que de modo muy reciente, se han descrito cambios madurativos en la vía de señalización de la Rho cinasa en arterias pulmonares porcinas (*Cogolludo y cols., 2005; Bailly y cols., 2004*). Si estos cambios son los responsables de las diferencias con la edad en la vasoconstricción mediada por isoprostanos, es algo que también requiere ser investigado en un futuro.

2 Efectos contráctiles de los isoprostanos en venas pulmonares

Las venas pulmonares han sido clásicamente consideradas como meros vasos de conducción. Sin embargo, en los últimos años, se ha acumulado una gran evidencia de la participación de las venas pulmonares en el control del tono vascular pulmonar y se ha observado que las venas pulmonares representan el lugar más importante de acción para determinados factores vasoactivos en diferentes especies animales y a diferentes edades (*Villamor y cols., 2000; Raj y cols., 1990; Gao y cols., 1998; 2005*). Las venas pulmonares están expuestas a una concentración de oxígeno más alta que las arterias pulmonares, pero esto no implica que exista una mayor actividad de defensas antioxidantes a este nivel (*Schmalfluss y cols., 1999; Villamor y cols., 2003*). Por este motivo, las venas pulmonares están expuestas a condiciones oxidativas más altas y por ello, al menos de un modo teórico, a una formación de isoprostanos más intensa. En nuestro trabajo, observamos que las venas pulmonares exhibieron una marcada respuesta vasoconstrictora a los isoprostanos y que esa vasoconstricción estuvo mediada por la estimulación del receptor TP. Es más, alguno de los isoprostanos, como sería el caso de 8-*iso* PGE₁ y 8-*iso* PGE₂, fueron marcadamente más potentes como vasoconstrictores en venas pulmonares que en arterias. Además, la potencia vasoconstrictora de 8-*iso* PGE₂ y 8-*iso* PGF_{2 α} , fue similar en las venas pulmonares a la del U46619. Sin embargo, los isoprostanos fueron marcadamente menos eficaces que el U46619. Finalmente y al igual que ocurría con las arterias pulmonares, alguno de los isoprostanos (8-*iso* PGE₂ y 8-*iso* PGF_{1 α}) produjeron una menor contracción en las venas pulmonares de dos semanas.

Los efectos de los isoprostanos sobre las venas pulmonares, han sido previamente evaluados en la especie humana (*Janssen y cols., 2001a*), canina (*Janssen y cols., 2001a*) y porcina (*Janssen y Tazzeo, 2002*), pero hasta el presente trabajo, no se había realizado este estudio en el periodo neonatal. Las venas pulmonares humanas, fueron contraídas también por los isoprostanos aunque estos demostraron una mayor potencia en las arterias (*Janssen y cols., 2001a*). La arteria pulmonar canina, por su parte, no respondió a isoprostanos, mientras que la vena lo hizo tanto a los compuestos con anillo E como a los compuestos con anillo F (*Janssen y cols., 2001a*). Por último, en los vasos pulmonares del cerdo adulto (*Janssen y Tazzeo, 2002*), las diferencias entre las contracciones mediadas por los isoprostanos en arterias y venas no parecen tan marcadas como las descritas en nuestro estudio para vasos neonatales.

3 Efectos contráctiles de los isoprostanos en arterias mesentéricas

Durante la vida fetal, la placenta asume no sólo la función respiratoria sino también la función nutricional. Al encontrarse el intestino fetal funcionalmente inactivo y con una baja demanda oxidativa, presenta una resistencia vascular alta (*Nankervis y cols., 2001a; Edelstone y Holzman, 1982*). En el momento del nacimiento, al asumir el intestino la función digestiva, se precisa un aumento en el aporte de oxígeno y consecuentemente del aporte sanguíneo (*Nankervis y cols., 2001a*). Este proceso de transición -al igual que ocurre en el pulmón, el otro sistema latente en la vida fetal- se acompaña de cambios funcionales extremos en la reactividad vascular del mesenterio (*Nankervis y cols., 2001a*). Los tres factores determinantes en el control del tono vascular mesentérico en lechones de un día de vida son el NO, la endotelina-1 y la respuesta miogénica del músculo liso vascular arterial (*Nankervis y cols., 2001b; Su y cols., 2003*). En animales de más edad, por el contrario, los vasos mesentéricos muestran una naturaleza mucho más pasiva y no responden a la inhibición de la NO sintasa, al bloqueo de los receptores de endotelina o a cambios de presión o flujo (*Nankervis y cols., 2001a; 2001b*).

De manera interesante, la respuesta contráctil mediada por los isoprostanos en arterias mesentéricas, disminuyó con la edad postnatal. Sin embargo, y al contrario de lo que ocurría en los vasos pulmonares, la sensibilidad de las arterias mesentéricas al U46619 también disminuyó con la edad. Aunque los datos de reactividad vascular obtenidos en arterias de conducción no son directamente a los vasos de resistencia, podríamos especular con la posibilidad de que la menor respuesta a la activación del receptor TP tanto por los isoprostanos como por el TXA₂, participe en la reducción de las resistencias vasculares mesentéricas durante los primeros días de vida postnatal.

4 Isoprostanos y relajación

La mayor parte de los estudios que se han centrado en los efectos vasculares de los isoprostanos, lo han hecho en sus acciones vasoconstrictoras. Sin embargo, algunos datos sugieren que ciertos isoprostanos, al igual que ocurre con las prostaglandinas, pudieran tener efectos vasodilatadores, que en muchos casos quedan enmascarados por la más potente acción vasoconstrictora (*Zhang y cols., 2003; Jourdan y cols., 1997*). En el presente trabajo, hemos observado que la 8-iso PGE₂ producía en arterias pulmonares una contracción mediada por el receptor TP que alcanzaba su máximo a la dosis de 10⁻⁶ M. Las siguientes dosis, produjeron una disminución del tono contráctil. Del mismo modo, cuando las arterias pulmonares fueron precontraídas con U46619, produciendo una marcada activación del receptor TP, la 8-iso PGE₂ en altas dosis (10⁻⁶-10⁻⁵M) produjo también efectos relajantes. Sin embargo, cuando las arterias fueron precontraídas con endotelina-1, la 8-iso PGE₂ sólo redujo el tono contráctil en presencia del antagonista del receptor TP, SQ 29,548. Nuestros datos sugieren, por tanto, que el efecto contráctil de la 8-iso PGE₂ sobre los receptores TP, enmascara en gran medida la capacidad de relajación vascular de este compuesto. Los otros isoprostanos estudiados (8-iso PGE₁, 8-iso PGF_{1α}, 8-iso PGF_{1β}, 8-iso PGF_{2α} y 8-iso PGF_{2β}), no mostraron ninguna acción relajante sobre arterias pulmonares bajo ninguna de las condiciones experimentales previamente descritas.

Jourdan y cols. (1997) en un estudio realizado en ratas, observó que la 8-iso PGF_{2α} producía una relajación dependiente de la dosis en arteria pulmonares precontraídas con U46619 o con adrenalina en presencia del antagonista del receptor TP, ICI 192605. Posteriormente otros autores han comprobado los efectos relajantes de 8-iso PGE₁ en venas pulmonares humanas y caninas y en arterias pulmonares caninas precontraídas con fenilefrina, en presencia del antagonista de ICI 192605. No obstante, los isoprostanos mostraron, en general, unas modestas eficacia y potencia relajante sobre el músculo liso vascular pulmonar cuando se comparó éste con el músculo liso respiratorio (Janssen y cols., 2000). Comprobados los escasos efectos relajantes de los isoprostanos en el lecho vascular pulmonar y conocidos los efectos relajantes de los mismos en arterias coronarias de animales adultos (Zhang y cols., 2003), quisimos dilucidar su acción en arterias coronarias de lechones de dos semanas. En arterias coronarias porcinas adultas precontraídas con U46619 se han descrito efectos relajantes mediados por la 8-iso PGE₂, y en menor medida la 8-iso PGE₁ y la 8-iso PGF_{2β} (Zhang y cols., 2003). Nosotros hemos observado también un efecto relajante mediado por 8-iso PGE₁, 8-iso PGE₂ y 8-iso PGF_{2α} en las arterias coronarias de lechón de dos semanas. Sin embargo, los efectos relajantes coronarios de los isoprostanos observados en nuestros experimentos son menores que los descritos por Zhang y cols. en los vasos adultos (Zhang y cols., 2003). De modo muy interesante, Belik y cols. describen una relajación mediada por 8-iso PGF_{2α} en la arteria pulmonar de rata adulta precontraída con U46619. Sin embargo, en el mismo vaso de ratas de 1-2 semanas la 8-iso PGF_{2α} no produjo efectos relajantes sino que aumentó el tono inducido por U46619 (Belik y cols., 2003; 2004). Por lo tanto, parecen existir marcados cambios con la edad también en la acción relajante de los isoprostanos.

Los receptores a través de los cuales los isoprostanos ejercen el efecto relajante, no se han identificado completamente. De nuevo y debido a la ya repetida semejanza estructural con las prostaglandinas se ha implicado a algunos de los receptores de éstas (Janssen, 2001). En el presente estudio y debido al modesto efecto relajante de los isoprostanos que hemos observado, no hemos llevado a cabo una caracterización farmacológica del receptor implicado en la respuesta. Sin embargo, hemos intentado dilucidar la posible presencia de receptores EP, DP e IP en nuestras preparaciones de arteria pulmonar mediante la utilización de agonistas específicos de estos receptores.

Así hemos observado que en las arterias pulmonares porcinas de dos semanas, la estimulación del receptor EP con misoprostol, PGE₁ o PGE₂ produjo una marcada relajación que no fue observada tras la estimulación de los receptores DP (con PGD₂) o IP (con Iloprost). En contraste con nuestros resultados, Walch y cols. (1999) al caracterizar los receptores de prostanoïdes que median la dilatación en el lecho vascular pulmonar humano, observaron la presencia de respuestas relajantes tras la estimulación de los receptores DP, e IP. Sin embargo, la estimulación de receptores EP no produjo relajación de las arterias pulmonares, aunque sí lo hizo en las venas. Por tanto, parece existir una importante diferencia dependiente de la especie en los mediadores de las acciones relajantes vasculares de los prostanoïdes. Desafortunadamente, este hecho limita de modo importante la extrapolación de nuestros datos en arterias porcinas al recién nacido humano.

En una última serie de experimentos utilizando el inhibidor de la NO sintetasa L-NAME, el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble ODQ y el inhibidor de la COX indometacina, hemos tratado de dilucidar la participación de las vías NO/GMPc y COX en la relajación mediada por 8-*iso* PGE₂ en las arterias pulmonares del lechón de dos semanas. Hemos observado que tanto el L-NAME como el ODQ, produjeron una atenuación del efecto relajante de la 8-*iso* PGE₂. Esto sugiere que este compuesto actúa al menos parcialmente a través de la liberación de NO. De manera coincidente con nuestros resultados, los efectos relajantes de la 8-*iso* PGF_{2α} en arterias pulmonares de rata, fueron también marcadamente reducidos por la presencia de L-NAME (Jourdan y cols., 1997; Belik y cols., 2003). Por el contrario, la presencia del inhibidor de la COX –indometacina- no produjo una reducción significativa de la relajación mediada por la 8-*iso* PGE₂. Por tanto, la vía de la COX no parece participar en esta relajación.

Conclusiones

F. CONCLUSIONES:

1.- Los isoprostanos tanto con anillo E (*8-iso* PGE₁, *8-iso* PGE₂) como con anillo F (*8-iso* PGF_{1α}, *8-iso* PGF_{1β}, *8-iso* PGF_{2α} y *8-iso* PGF_{2β}) aumentan de modo dosis-dependiente el tono del músculo liso vascular a nivel de los lechos vasculares pulmonar y mesentérico.

2.- La *8-iso* PGE₂ es el isoprostano más potente en arterias pulmonares y el más potente y eficaz en venas pulmonares, tanto de animales recién nacidos como de 2 semanas de edad. La *8-iso* PGF_{2α} es el más eficaz en arterias pulmonares.

3.- La eficacia de *8-iso* PGE₂ y de *8-iso* PGF_{2α} es equiparable a la del agonista del receptor de tromboxano A₂ (receptor TP) U46614 en venas pulmonares. Sin embargo, en arterias pulmonares, tanto la eficacia como la potencia del al U46619 fue muy superior a la de los isoprostanos estudiados. En arterias mesentéricas, la *8-iso* PGE₂ fue el isoprostano más potente y eficaz, equiparable en eficacia a U46619.

4.- La capacidad contráctil de los isoprostanos disminuye con la edad postnatal. Así la contracción mediada por *8-iso* PGE₂ y *8-iso* PGF_{1β} en la arteria pulmonar, es menor en el animal de dos semanas que en el recién nacido. En la vena pulmonar, la contracción es menor en animales de dos semanas para *8-iso* PGE₂ y *8-iso* PGF_{1α}. En la arteria mesentérica, la disminución del efecto contráctil con la edad se encuentra para *8-iso* PGE₂, *8-iso* PGF_{1α}, *8-iso* PGF_{2α} y *8-iso* PGF_{2β}. La sensibilidad U46619 también disminuye con la edad postnatal en la arteria mesentérica, pero no en la arteria o en la vena pulmonar.

5.- Los isoprostanos con anillo E producen una vasoconstricción más potente en venas que en arterias pulmonares.

6.- Los isoprostanos estudiados indujeron contracción a través de la estimulación del receptor TP. La vía de señalización intracelular implica la activación de la tiosina cinasa acoplada a la Rho cinasa.

7.- La 8-*iso* PGE₂ produce también relajación en las arterias pulmonares y arterias coronarias de lechones de 2 semanas pero no en venas pulmonares ni en arterias mesentéricas. Los efectos relajantes la 8-*iso* PGE₂ se enmascaran por su capacidad para producir contracción mediante la estimulación del receptor TP. Sólo cuando el receptor TP se encuentra ocupado por un agonista o bloqueado por un antagonista se visualizan los efectos relajantes de de la 8-*iso* PGE₂.

8.- Los efectos relajantes la 8-*iso* PGE₂ en arterias pulmonares aumentan con la edad postnatal y están, al menos en parte, mediados a través de la liberación de NO.

9.- En nuestras condiciones experimentales, la estimulación del receptor EP produce relajación en la arteria pulmonar del lechón de 2 semanas. Este efecto no se detecta tras la estimulación de los receptores IP y DP.

Bibliografía

G. BIBLIOGRAFÍA

Abman SH, Shanley PF, Accurso FJ. Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs. *J Clin Invest* 1989a; **83**:1849-1858.

Abman SH, Accurso FJ. Acute effects of partial compression of ductus arteriosus on fetal pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1989b; **257**:626-634.

Abman SH, Chatfield BA, Hall SL, McMurtry IF. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *Am J Physiol* 1990; **259**:1921-1927.

Abman SH, Chatfield BA, Rodman DM, Hall SL, McMurtry IF. Maturation changes in endothelium-derived relaxing factor activity of ovine pulmonary arteries in vitro. *Am J Physiol* 1991; **260**: L280-L285.

Abman SH, Stenmark KR. Changes in lung eicosanoid content during normal and abnormal transition in perinatal lambs. *Am J Physiol*. 1992; **262**: 214-222.

Abman S, Griebel J, Parker D, Schmidt J, Swanton D, Kinsella J. Acute effects of inhaled nitric oxide in children with severe hypoxemic respiratory failure. *J Pediatr* 1994; **124**: 881-888.

Abman SH, Stevens T. Perinatal pulmonary vasoregulation: implications for the pathophysiology and treatment of neonatal pulmonary hypertension. In: Haddad G, Lister G, eds. Tissue Oxygen Deprivation: *Developmental, Molecular and Integrative Function*. Marcel Dekker, New York, 1996, 367-432.

Abman SH. Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Rev (Online)* 1999; **20**: 103-109.

Adeagbo A. and Henzel MK. Calcium dependent phospholipase A2 mediates the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor in perfused rat mesenteric prearteriolar bed. *J Vasc Res* 1998;**35**, 27-35

Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier P-E. Loss of endothelium dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991; **87**:155-162.

Ahola T, Fellman V, Kjellmer I, Raivio KO, Lapatto R. Plasma 8-Isoprostane is increased in Preterm Infants who develop bronchopulmonary dysplasia or periventricular leukomalacia. *Pediatr Res* 2004;**56**:88-93.

Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, Schaffer MS, Wolfe RR, Abman SH. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension.

Association with acute hypoxic pulmonary vasoreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**: 519-522.

Archer S, Michelakis E. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O(2) sensors, and controversies. *News Physiol Sci* 2002; **17**: 131-137.

Archer SL, Wu XC, Thebaud B, Nsair A, Bonnet S, Tyrrell B, McMurtry MS, Hashimoto K, Harry G, Michelakis ED. Preferential expression and function of voltage-gated, O₂-sensitive K⁺ channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction: ionic diversity in smooth muscle cells. *Circ Res* 2004; **95**:308-318.

Arrigoni FI, Hislop AA, Pollock JS, Haworth SG, Mitchell JA. Birth upregulates nitric oxide synthase activity in the porcine lung. *Life Sci* 2002; **70**: 1609-1620.

Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA. Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF₂α-III and iPE₂-III are mediated via the thromboxane A₂ receptor in vivo. *Circulation* 2000; **101**:2833-2840.

Bachi A, Zuccato E, Baraldi M, Fanelli R, Chiabrando C. Measurement of urinary 8-Epi-prostaglandin F₂α, a novel index of lipid peroxidation *in vivo*, by immunoaffinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal levels in smokers and nonsmokers. *Free Radic Biol Med* 1996; **20**: 619-624.

Badesch DB, Orton EC, Zapp LM, Westcott JY, Hester J, Voelkel NF, Stenmark KR. Decreased arterial wall prostaglandin production in neonatal calves with severe chronic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; **1**:489-498.

Bailly K, Ridley AJ, Hall SM, Haworth SG. RhoA activation by hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle cells is age and site specific. *Circ Res* 2004; **94**:1383-1391.

Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF₂α, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992; **263**: H660-H663.

Baraldi E, Ghiso L, Piovan V, Carraro S, Ciabattini G, Barnes PJ, Montuschi P. Increased Exhaled 8-Isoprostane in Childhood Asthma. *Chest* 2003; **124**:25-31.

Barden A, Beilin LJ, Nitchie J, Croft DK, Walters BN, Michael CA. Plasma and urinary 8-iso-prostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci (Colch)* 1996; **91**:711-718.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; **95**:115-128.

Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE. H₂O₂ opens BKCa channels via the PLA₂-arachidonic acid signalling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 2000; **279**: 475-483

- Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 1995; **47**:87-131.
- Barrington y Finer. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2001; Issue 4. Art. No.: 10.1002/14651858.CD000509.
- Bauersachs J, Hecker M, Busse R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450- derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol* 1994; **113**:1548–1553
- Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; **75**:725-748.
- Beiche F, Scheurer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. Up-regulation of cyclo-oxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 1996; **390**: 165-169.
- Belik J. Myogenic response in large pulmonary arteries and its ontogenesis. *Pediatr Res* 1994; **36**:34-40.
- Belik J, Jankov RP, Pan J, Yi M, Pace-Asciak CR, Tanswell AK. Effect of 8-isoprostaglandin F_{2α} on the newborn rat pulmonary arterial muscle and endothelium. *J Appl Physiol* 2003;**95**: 1979–1985.
- Belik J, Jankov RP, Pan J, Yi M, Chaudhry I, Tanswell AK. Chronic O₂ exposure in the newborn rat results in decreased pulmonary arterial nitric oxide release and altered smooth muscle response to isoprostone. *J Appl Physiol* 2004;**96**:725–730.
- Berkenbosch JW, Baribeau J, Ferretti E, Perreault T. Role of protein kinase C and phosphatases in the pulmonary vasculature of neonatal piglets. *Crit Care Med* 2001; **29**: 1229-1233.
- Berkov S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat. The necessary role of angiotensin II. *Circ Res* 1974; **35**:256-261.
- Bkaily G, Peyrow M, Yamamoto T, Sculptoreanu A, Jacques D, Sperelakis N. Macroscopic Ca²⁺ -Na⁺ and K⁺ currents in single heart and aortic cells. *Mol Cell Biochem* 1988; **80**:59-72.
- Black SM, Johengen MJ, Ma ZD, Bristow J, Soifer SJ. Ventilation and oxygenation induce endothelial nitric oxide synthase gene expression in the lungs of fetal lambs. *J Clin Invest* 1997; **100**:1448-1458.
- Blanco CE, Dawes GS, Hanson MA, McCooke HB. The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs. *J Physiol (Lond)* 1984; **351**:25-37.
- Blanco CE, Martin CB, Rankin J, Landauer M, Phernetton T. Changes in fetal organ flow during intrauterine mechanical ventilation with or without oxygen. *J Dev Physiol* 1988; **10**:53-62.

Boels PJ, Deutsch J, Gao B, Haworth SG. Maturation of the response to bradykinin in resistance and conduit pulmonary arteries. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:416-428.

Boels PJ, Deutsch J, Gao B, Haworth SG. Perinatal development influences mechanisms of bradykinin-induced relaxations in pulmonary resistance and conduit arteries differently. *Cardiovasc Res*. 2001;**51**:140-150.

Bouayad A, Bernier SG, Asselin P, Hardy P, Bhattacharya M, Quiniou C, Fouron J, Guerguerian A, Varma DR, Clyman RI, Chemtob S. Characterization of PGE₂ receptors in fetal and newborn ductus arteriosus in the pig. *Semin Perinatol* 2001; **25**: 70-75.

Bouchet M, Renaudin MH, Raveau C, Mercier JC, Dehan M, Zupan V. Safety requirement for use of inhaled nitric oxide in neonates. *Lancet* 1993; **341**:968-969.

Brannon TS, MacRitchie AN, Jaramillo MA, Sherman TS, Yuhanna IS, Margraf LR, Shaul PW. Ontogeny of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in ovine lung. *Am J Physiol* 1998; **274**: 66-71.

Bui KC, Martin G, Kammerman LA, Hammerman C, Hill V, Short BL. Plasma thromboxane and pulmonary artery pressure in neonates treated with extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; **104**:124-129.

Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185**:960-966

Cacoub P, Dorent R, Maistre G, Nataf P, Carayon A, Piette C, Godeau P, Cabrol C, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol* 1993; **71**:448-450.

Calamandrei G, Venerosi AP, Valanzano A, de Berardinis MA, Greco A, Puopolo M, Minghetti L. Increased brain levels of F2-isoprostane are an early marker of behavioral sequels in a rat model of global perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 2004;**55**:85-92.

Campbell AG, Dawes GS, Fishman AP, Hyman AI. Pulmonary vasoconstriction and changes in heart rate during asphyxia in immature foetal lambs. *J Physiol (Lond)* 1967a; **192**:93-110.

Campbell AG, Cockburn F, Dawes GS, Milligan JE. Pulmonary vasoconstriction in asphyxia during cross-circulation between twin foetal lambs. *J Physiol (Lond)* 1967b; **192**:111-121

Carpenter, CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998;**114**: 1653-1659.

Cassin S, Dawes GS, Mott JC, Ross BB, Strang LB. Vascular resistance of the foetal and newly ventilated lung of the lamb. *J Physio* 1964; **171**:61-79.

Cassin S, Kristova V, Davis T, Kadowit P, Gause G. Tone-dependent responses to endothelin in the isolated perfused fetal sheep pulmonary circulation in situ. *J Appl Physiol* 1991; **70**:1228-1234.

Castillo L, DeRojas-Walker T, Yu YM, Sanchez M, Chapman TE, Shannon D, Tannenbaum S, Burke JF, Young VR. Whole body arginine metabolism and nitric oxide synthesis in newborns with persistent pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 1995; **38**:17-24.

Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: Evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:1724-1728.

Chatfield BA, McMurtry IF, Hall SL, Abman SH. Hemodynamic effects of endothelin-1 on ovine fetal pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1991; **261**: 182-187

Chiabrando, C, Valagussa A, Rivalta C, Durand T, Guy A, Zuccato E, Villa P, Rossi JC, and Fanelli R. Identification and measurement of endogenous beta-oxidation metabolites of 8-epi-prostaglandin F2 α . *J Biol Chem* 1999; **274**: 1313-1319.

Chehne F, Oguogho A, Lupattelli G, Budinsky AC, Palumbo B, Sinzinger H. Increase of isoprostane 8-epi- PGF2 α after restarting smoking. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; **64**:307-310.

Christou H, Adatia I, Van Marter LJ, Kane JW, Thompson JE, Stark AR, Wessel DL, Kourembanas S. Effect of inhaled nitric oxide on endothelin-1 and cyclic guanosine 5'-monophosphate plasma concentrations in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1997; **130**:603-611.

Cirino G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclo-oxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 105-111.

Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davì G, Cuccurullo F, and Patrono C. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000; **102**:1007-1013.

Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, Abramson SB. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol* 2000; **165**:1582-1587.

Coceani F, Olley PM: Eicosanoids in the fetal and transitional pulmonary circulation. *Chest* 1988; **93**:112-117.

Cogolludo A, Pérez-Vizcaíno F, Zaragoza-Arnáez F, Ibarra M, López-López G, López-Miranda V, Tamargo J. Mechanism involved in SNP-induced relaxation and [Ca²⁺]_i reduction in piglet pulmonary and systemic arteries. *Br J Pharmacol* 2001; **132**: 959-967.

Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Thromboxane A₂-Induced Inhibition of Voltage-Gated K⁺ Channels and Pulmonary Vasoconstriction. Role of Protein Kinase C ζ . *Circ Res* 2003;**93**:656-663.

Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K⁺ channel to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2005; **1**:66:84-93.

Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumley P. Prostanoids and their receptors. *Comprehensive Medicinal Chemistry Membranes and Receptors*, edited by J. C. Emmett. Oxford, UK: Pergamon, 1990; **3**:643–714.

Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A., Sheldrick RLG. A novel inhibitory receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 1994;**47**:151–168.

Collins, CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, and Garg ML. Elevated plasma levels of F_{2_{is}} isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids* 1999;**34**:551-556.

Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F₂-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004;**37**:724-732.

Cornfield DN, Chatfield BA, McQueston JA, McMurtry IF, Abman SH. Effects of birth-related stimuli on L-arginine -dependent pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol* 1992; **262**:1474-1481.

Cracowski JL, Tremel F, Marpeau C, Baguet JP, Stanke-Labesque F, Mallion JM, Bessard G. Increased formation of F₂-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart* 2000a;**84**:439-440.

Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Devillier P, Chavanon O, Hunt M, Souvignet C, Bessard G. Human internal mammary artery contraction by isoprostaglandin F_{2 α} type-III (8-iso prostaglandin F_{2 α}). *Eur J Pharmacol* 2000b;**397**:161–168.

Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular Biology of the Isoprostanes. *Journal of Vascular Research* 2001a;**38**:93-103.

Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G, Pepin JL, Bessard J, Schwebel C, Stanke-Labesque F, Pison C. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. 2001b *Am J Respir Crit Care Med* **164**:1038-1042.

Cracowski JL, Devillier P, Chavanon O, Sietchiping-Nzepa FA, Stanke-Labesque F, Bessard G. Isoprostaglandin E₂ type III (8-iso-prostaglandin E₂) evoked contractions in human internal mammary artery. *Life Sci* 2001c;**68**:2405-2413.

Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2002;**23**:360-366.

Crankshaw DJ, Rangachari PK. Isoprostanes: more than just mere markers. *Mol Cell Biochem* 2003 ;**253**:125-130.

Darius H, Smith JB, Lefer AM. Beneficial effects of a new potent and specific thromboxane receptor antagonist (SQ-29,548) in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;**235**:274-281.

Davenport AP, Kuc RE, Mockridge JW. Endothelin-converting enzyme in the human vasculature: evidence for differential conversion of big endothelin-3 by endothelial and smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **31** Suppl 1:S1-S3

Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, Cipollone F, Bittolo Bon G, Ciabattoni G, Patrono C. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F_{2α} is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:3230-3235.

Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Constantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2α} and platelet activation in diabetes mellitus: Effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;**99**:224-229.

Davidson D, Barefield ES, Kattwinkel J, Dudell G, Damask M, Straube R, Rhines J, Chang CT. Inhaled nitric oxide for the early treatment of persistent pulmonary hypertension of the term newborn: a randomized, double-masked, placebo-controlled, dose-response, multicenter study. The I-NO/PPHN Study Group. *Pediatrics* 1998; **101**:325-334.

Dawes GS. Pulmonary circulation in the foetus and new-born. *Br Med Bull.*1966; **22**:61-65.

Delanty, N, Reilly MP, Praticò D, FitzGerald DJ, Lawson JA, and FitzGerald GA. 8-Epi PGF_{2α}: specific analysis of an isoicosanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 1996;**42**:15-19.

Devillier P, Bessard G. Thromboxane A₂ and related prostaglandins in airways. *Fundam Clin Pharmacol* 1997;**11**:2-18.

Di Mari JF, Mifflin RC, Adegboyega PA, Saada JI, Powell DW. IL-1α-induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKCζeta-ROS pathway. *Gastroenterology* 2003;**124**:1855-1865.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Nat. Acad Sci USA* 1994; **91**:4214-4218.

Dinh Xuan AT, Higginbottam TW, Clelland C, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, Wallwork J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; **324**:1539-1547.

Docherty C, MacLean MR. Development of endothelin receptors in perinatal rabbit pulmonary resistance arteries. *Br J Pharmacol* 1998a;**124**:1165-1174.

Docherty CC, MacLean MR. EndothelinB receptors in rabbit pulmonary resistance arteries: effect of left ventricular dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 1998b;**284**:895-903.

Dollberg S, Warner BW, Myatt L. Urinary nitrite and nitrate concentrations in patients with idiopathic persistent pulmonary hypertension of the newborn and effect of extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Res* 1995;**37**:31-34.

Drummond, WH, and Bissonnette JM. Persistent pulmonary hypertension in the neonate: development of an animal model. *Am J Obstet Gynecol* 1978;**131**: 761-763.

Dunn J, Lorch V, Sinha S. Responses of small intrapulmonary arteries to vasoactive compounds in the fetal and neonatal lamb: norepinephrine, serotonin and potassium chloride. *Pediatr Res* 1989; **25**: 360-363.

Dworski, R, Roberts LJ, Murray JJ, Morrow JD, Hartert TV, and Sheller JR. Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F₂-isoprostane 15-F_{2t}-IsoP (8-iso PGF_{2α}). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**: A331.

Edelstone DI, Holzman IR. Fetal intestinal oxygen consumption at various levels of oxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1982; **242**: 50-54.

Elmhurst, JL, Betti PA, and Rangachari PK. Intestinal effects of isoprostanes: evidence for the involvement of prostanoid EP and TP receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **282**:1198-1205.

Evans, AR, Junger H, Southall MD, Nicol GD, LS, Sorkin Broome JT, Bailey TW, Vasko MR. Isoprostanes, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **293**: 912-920.

Feillet-Coudray C, Tourtauchaux R, Niculescu N, Rock E, Tauveron I, Alexandre-Gouabau M, Rayssiguier R, Jalenques YI, Mazur A. Plasma levels of 8-epi-PGF_{2α}, an in vivo marker of oxidative stress, are not affected by aging or Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**:463-469.

Feng L, Xia Y, García GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclo-oxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-α and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1669-1675.

Figueras J, Carbonell X, Demestre X, Diaz A, Fina A et al. Response to the administration of inhaled nitric oxide in the newborn infant. *RELAN* 1998;**1**:47-55.

Figueras J, Castillo F, Elorza D, Sanchez-Luna M, Barrio C Y cols. Recomendaciones para la utilización del óxido nítrico inhalado en patología neonatal. *An Esp Pediatr* 2001;**55**:251-255.

Figueras J. Óxido Nítrico inhalado en patología neonatal. *De guardia en Neonatología*. 2003. Ed: Ergon. ISBN: 84-8473-213-4.

Figueras-Aloy J, Gomez L, Rodriguez-Miguel JM, Jordan Y, Salvia MD, Jimenez W, Carbonell-Estrany X. Plasma nitrite/nitrate and endothelin-1 concentrations in neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003;**9**:582-587.

Fineman JR, Soifer SJ, Heymann MA. The role of pulmonary vascular endothelium in perinatal pulmonary circulatory regulation. *Sem Perinatol* 1991; **15**: 58-62.

Fineman JR, Wong J, Morin III FC, Wild LM, Soifer SJ. Chronic nitric oxide inhibition in utero produces persistent pulmonary hypertension in newborn lambs. *J Clin Invest* 1994; **93**:2675-2683.

Fineman JR, Soifer SJ, Heymann MA. Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period. *Annu Rev Physiol* 1995;**57**:115-134.

Finer NN, Etches PC, Kamstra B, Tierney AJ, Peliowski A, Ryan CA. Inhaled nitric oxide in referred for extracorporeal membrane oxygenation: dose response. *J Pediatr* 1994; **124**: 302-308.

Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2001; **4**: CD000399.

Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976; **38**:221-223

FitzGerald, DA, Wood LG, Gibson PG, Cooper DM, and Garg ML. Elevated plasma 8-isoprostanes: marker of asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**: A332.

Fukunaga M, Yura T, and Badr KF. Stimulatory effect of 8-epi-PGF_{2α}, an F₂-isoprostane, on endothelin-1 release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; **26**:51-52.

Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993a; **264**: 1619-1624.

Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. Vascular smooth muscle actions and receptor interactions of 8-iso-prostaglandin E₂, an E₂-isoprostane. *Biochem Biophys Res Commun* 1993b;**195**: 507-515.

Fukunaga M, Yura T, Grygorczyk R, Badr KF. Evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; **272**: 477-483.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)* 1980; **288**:373-376.

Gao Y, Tolsa JF, Botello M, Raj JU. Developmental change in isoproterenol-mediated relaxation of pulmonary veins of fetal and newborn lambs. *J Appl Physiol* 1998; **84**:1535-1539.

Gao Y, Raj JU. Role of veins in regulation of pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; **288**: 213–226.

Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T. The effects of phosphoramidon on the regional haemodynamic responses to human proendothelin (1-38) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1991; **103**:2009-2015.

Gardan B, Cracowski JL, Sessa S, Hunt M, Stanke-Labesque F, Devillier P, Bessard G. Vasoconstrictor effects of iso-prostaglandin F_{2α} type-III (8-iso-prostaglandin F_{2α}) on human saphenous veins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; **35**:729–734.

Geggel RL, Aronovitz MJ, Reid LM. Effects of chronic in utero hypoxemia on rat neonatal pulmonary arterial structure. *J Pediatr* 1986; **108**:756-759.

Geggel RL. Inhalational nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator for treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1993; **123**: 76-79.

Gersony WM, Morishima HO, Daniel SS, Kohl S, Cohen H, Brown W, James LS. The hemodynamic effects of intrauterine hypoxia: an experimental model in newborn lambs. *J Pediatr* 1976; **89**:631-635.

Ghanayem NS, Gordon JB. Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate. *Respir Res* 2001; **2**: 139-144.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Eng. J Med* 1993; **328**:1732-1739.

Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New Engl J Med* 1995; **333**:214-221.

Goil, S, Truog WE, Barnes C, Norberg M, Rezaiekhalthigh M, and Thibeault D. Eight-epi-PGF_{2α}: a possible marker of lipid peroxidation in term infants with severe pulmonary disease. *J Pediatr* 1998; **132**: 349-351.

Goldberg, S J, Levy RA, Siassi B, and Betten J. The effects of maternal hypoxia and hyperoxia upon the neonatal pulmonary vasculature. *Pediatrics* 1971; **48**:528-533.

Goldman AP, Tasker RC, Haworth SG, Sigston PE, Macrae DJ. Four patterns of response to inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1996; **98**: 706-713.

Gopaul NK, Anggard E, E, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourroz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF_{2α} levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; **368**:225-229.

Gopaul NK, Zacharowski K, Halliwell B, Anggard EE. Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F2-isoprostane levels. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**:806–814.

Gordon JB, Hortop J, Hakim TS. Developmental effects of hypoxia and indomethacin on distribution of vascular resistance in lamb lungs. *Pediatr Res* 1989; **26**: 325-329.

Graser T, Vanhoutte PM. Hypoxic contraction of canine coronary arteries: role of endothelium and cGMP. *Am J Physiol* 1991; **261**: 1769-1777.

Greco, A, Minghetti L, Sette G, Fieschi C, and Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1999;**53**:1876-1879.

Greenough A. Inhaled nitric oxide in the neonatal period. *Expert Opin Invest Drugs* 2000; **9**: 1601-1609.

Grover TR, Rairigh RL, Zenge JP, Abman SH, Kinsella JP. Inhaled carbon monoxide does not cause pulmonary vasodilation in the late-gestation fetal lamb. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;**278**: 779-784.

Hall SM, Gorenflo M, Reader J, Lawson D, Haworth SG. Neonatal pulmonary hypertension prevents reorganisation of the pulmonary arterial smooth muscle cytoskeleton after birth. *J Anat* 2000;**196**: 391-403.

Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 1985;**8**:189-193.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 598-620.

Hallman M, Bry K, Turbow R, Waffarn F, Lappalainen U. Pulmonary toxicity associated with nitric oxide in term infants with severe respiratory failure. *J Pediatr* 1998; **132**:827-829.

Hammerman C, Komar K, Meadow W, Strates E. Selective inhibition of thromboxane synthetase reduces group-B-beta-hemolytic-streptococci-induced pulmonary hypertension in piglets. *Dev Pharmacol Ther* 1988; **11**:306-312.

Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke WR. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am J Physiol* 1998; **275**: 931-941.

Hartsfield, CL, Alam J, and Choi AM. Differential signaling pathways of HO-1 gene expression in pulmonary and systemic vascular cells. *Am J Physiol* 1999;**277**:1133-1141.

Hauge A. Role of histamine in hypoxic pulmonary hypertension in the rat. I. Blockade or potentiation of endogenous amines, kinins, and ATP. *Circ Res* 1968; **22**:371-383.

Haworth, SG, and Reid L. Persistent fetal circulation: Newly recognized structural features. *J Pediatr* 1976; **88**: 614-620.

Haworth SG, Hislop A. Adaptation of the pulmonary circulation to extra-uterine life in the pig and its relevance to the human infant. *Cardiovasc Res* 1981; **15**: 108-119.

Haworth SG, Hislop AA. Lung development-the effects of chronic hypoxia. *Semin Neonatol* 2003;**8**: 1-8.

Hazbun, ME, Hamilton R, Holian A, Eschenbacher WL. Ozone-induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F_{2α} in the airways of human subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;**9**: 568-572.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y.. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1998; **32**:642–649.

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 1994; **481**: 407–414.

Helmersson J, Mattsson P, Basu S. Prostaglandin F_{2α} metabolite and F₂-isoprostane excretion in migraine. *Clin Sci* 2002;**102**:39–43.

Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;**14**:409-420.

Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **15**:993-999.

Heymann JR, Adams A, Gardner TH. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: trends in incidence, diagnosis and management. *Am J Dis Child*. 1984;**138**:592–595.

Heymann MA, LeBidois J, Soifer SJ, Clyman RI. Leukotriene synthesis inhibition increases pulmonary blood flow in fetal lambs. *Chest* 1988; **93**: 117.

Heymann MA. Regulation of the pulmonary circulation in the perinatal period and in children. *Intensive Care Med* 1989; **15**: 9-12.

Hinchcliff KW, Reinhart GA, DiSilvestro R, Reynolds A, Blostein-Fujii A, Swenson RA.. Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *Am J Vet Res* 2000; **61**:512–517

Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S. *Nature (London)* 1991;**349**: 617-620.

Hislop AA, Springal DR, BATTERY LDK, Pollock JS, Haworth SG. Abundance of endothelial nitric oxide synthase in newborn intrapulmonary arteries. *Arch Dis Child* 1995;**12**: 17-21.

Hislop AA, Boels PJ, Deutsch J, Polak JM, Haworth SG. Developmental changes in binding sites and reactivity for CGRP and VIP in porcine pulmonary arteries. *Peptides* 1998;**19**:703-714.

Hobbs AJ, Ignarro LI. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. In: Zapol WM & Bloch KD (eds.) Nitric oxide and the lung. Marcel Dekker, New York, 1997, Pp 1-57.

Hoffman SW, Moore S, Ellis EF: Isoprostanes: Free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* 1997;**28**:844-849.

Holden, W. E., McCall E. Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. *Exp Lung Res* 1984; **7**:101-112.

Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis* 1991;**143**:188-203.

Horton EW. Biological activities of pure prostaglandins. *Experientia* 1965;**15**:113-118.

Hou, X, Gobeil F, Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts J, II, Varma DR, and Chemtob S. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F_{2t}-isoprostane (8-iso-prostaglandin F_{2t}) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke* 2000;**31**: 516-525.

Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;**30**:1425-1436.

Hutcheson IR, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of gap junctions and phospholipase A2. *Circ Res* 1999;**84**: 53-63.

Huttner JJ, Gwebu ET, Panganamala RV, Milo GE, Cornwell DC, Sharma HM, Geer JC. Fatty acids and their prostaglandin derivatives: inhibitors of proliferation in aortic smooth muscle cells. *Science* 1977; **197**:289-291.

Ibe BO, Anderson JM, Raj JU. Leukotriene synthesis by isolated perinatal ovine intrapulmonary vessels correlates with age-related changes in 5-lipoxygenase protein. *Biochem Mol Med* 1997;**61**:63-71.

Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, Tamai H, Takeshita A. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ;**22**:438-452.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 9265-9269.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:2863-2867

Iuliano L, Praticò D, Ferro D, Pittoni V, Valesini G, Lawson J, FitzGerald GA, Violi F. Enhanced lipid peroxidation in patients positive for antiphospholipid antibodies. *Blood* 1997; **90**: 3931-3935.

Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. Physiologic characterization of endothelin A and B receptor activity in the ovine fetal pulmonary circulation. *J Clin Invest* 1994; **93**:2141-2148.

Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. Endothelin blockade augments pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *J Appl Physiol* 1996a; **81**:2481-2487.

Ivy DD, Ziegler JW, Dubus MF, Fox JJ, Kinsella JP, Abman SH. Chronic intrauterine pulmonary hypertension alters endothelin receptor activity in the ovine fetal lung. *Pediatr Res* 1996b; **39**:435-442.

Ivy DD, Parker TA, Ziegler JW, Galan HL, Kinsella JP, Tudor RM, Abman SH. Prolonged endothelin A receptor blockade attenuates chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *J Clin Invest* 1997; **99**:1179-1186.

Ivy DD, Le Cras TD, Horan MP, Abman SH. Increased lung preproET-1 and decreased ETB-receptor gene expression in fetal pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1998; **274**: 535-541.

Ivy DD, Lee DS, Rairigh RL, Parker TA, Abman SH. Endothelin B receptor blockade attenuates pulmonary vasodilation in oxygen-ventilated fetal lambs. *Biol Neonate* 2004; **86**:155-159.

Iwamoto J, Morin F. Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. *J Appl Physiol* 1993; **75**: 2332-2336.

Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, and Crankshaw DJ. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **295**: 506-511.

Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Coruzzi J, and Cox PG. Vasoconstrictor actions of isoprostanes via tyrosine phosphorylation and Rho kinase in human and canine pulmonary vascular smooth muscles. *Br J Pharmacol* 2001a; **132**:127-134.

Janssen LJ, Lu-chao H, Netherton S. Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase. *Am J Physiol* 2001b; **280**:L666-L674.

Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **280**: 1067-1082.

Janssen LJ, Tazzeo T. Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**301**:1060-1066.

Janssen LJ. Are endothelium-derived hyperpolarizing and contracting factors isoprostanes? *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2002;**23**: No.2.

John E, Roberts V, Burnard E. Persistent pulmonary hypertension of the newborn created with hyperventilation: clinical features and outcome. *Aust Paediatr J* 1988;**24**:357-361.

John GW, Valentin JP. Analysis of the pulmonary hypertensive effects of the isoprostane derivative, 8-iso-PGF₂α, in the rat. *Br J Pharmacol* 1997;**122**: 899-905.

Johns RA, Linden JM, Peach MJ. Endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia. *Circ Res* 1989; **65**:1508-1515.

Jones OW, Abman SH. Systemic and pulmonary hemodynamic effects of big endothelin-1 and phosphoramidon in the ovine fetus. *Am J Physiol* 1994; **266**:929-955.

Jourdan KB, Evans TW, Curzen NP, Mitchell JA. Evidence for a dilator function of 8-iso prostaglandin F₂ α in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1997;**120**:1280-1285.

Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH, Banerjee M. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F_{2α} in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1993;**74**: 460-465.

Karamsetty VS, Kane KA, Wadsworth RM. The effects of chronic hypoxia on the pharmacological responsiveness of the pulmonary artery. *Pharmacol Ther* 1995;**68**: 233-246.

Kavvadia V, Greenough A, Lilley J, Laubscher B, Dimitriou G, Boa F, Poyser K. Plasma arginine levels and the response to inhaled nitric oxide in neonates. *Biol Neonate* 1999;**76**:340-347.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-Epi-PGF_{2α}, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;**153**: 590-596.

Keith IM, Tjen-A-Looi S, Kraiczi H, Ekman R. Three-week neonatal hypoxia reduces blood CGRP and causes persistent pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;**279**:1571-1578.

Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH. Low-dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**:819-820.

Kinsella JP, Abman SH. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995;**126**:853-864.

Kinsella JP, Parker TA, Galan H, Sheridan BC, Halbower AC, Abman SH. Effectes of inhaled nitric oxide on pulmonary edema and lung neutrophil accumulation in severe experimental hyaline membrane disease. *Pediatr Res* 1997a; **41**: 457-463.

Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF, Goldberg RN, Bancalari E, Mayock DE, Redding GJ, deLemos RA, Sardesai S, McCurnin DC, Moreland SG, Cutter GR, Abman SH. Randomized multicenter trial of inhaled nitric oxide and high-frequency oscillatory ventilation in severe persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1997b; **131**: 55-62.

Kinsella JP, Walsh WF, Bose CL, Gerstmann DR, Labella JJ, Sardesai S, Walsh-Sukys MC, McCaffrey MJ, Cornfield DN, Bhutani VK, Cutter GR, Baier M, Abman SH. Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; **354**: 1061-1065.

Kinsella BT. Thromboxane A2 signalling in humans: a 'tail' of two receptors. *Biochem Soc Trans* 2001;**29**:641-654.

Kinsella JP, Griebel J, Schmidt JM, Abman SH. Use of inhaled nitric oxide during interhospital transport of newborns with hypoxemic respiratory failure. *Pediatrics* 2002;**109**:158-161.

Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed, in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 1997;**122**:217-224.

Kirschvink N, Smith N, Fievez L, Bougnet V, Art T, Degand G, Marlin D, Roberts C, Genicot B, Lindsey P, Lekeux P. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. *Equine Vet J* 2002;**34**:563-571.

Konduri GG, Wooddard LL. Selective pulmonary vasodilation by low-dose infusion of adenosine triphosphate in newborn lambs. *J Pediatr* 1991; **119**: 94-102.

Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;**9**:371-377.

Kolber KA, Gao Y, Raj JU. Maturation changes in endothelium-derived nitric oxide-mediated relaxation of ovine pulmonary arteries. *Biol Neonate* 2000;**77**:123-130.

Kovitz KL, Aleskowitch TD, Sylvester JT, Flavahan NA. Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1993; **265**:H1139-H1148.

Konduri GG, Ou J, Shi Y, Pritchard KA Jr Decreased association of HSP90 impairs endothelial nitric oxide synthase in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **285**: 204-211.

Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F_{2α}. *Br J Pharmacol* 1996;**119**: 1276-1280.

Kromer BM, Tippins JR. Actions of 8-epi prostaglandin F_{2α} on isolated rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;**32**: 471-478.

Kromer BM, Tippins JR. The vasoconstrictor effect of 8-epi prostaglandin F_{2α} in the hypoxic rat heart. *Br J Pharmacol* 1999;**126**:1171-1174.

Kunapuli P, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Functional characterization of the ocular prostaglandin f₂alpha (PGF₂alpha) receptor. Activation by the isoprostane, 12-iso-PGF₂alpha. *J Biol Chem* 1997;**272**:27147-27154.

Kunsch CH, Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Cir Res* 1999; **85**: 753-766.

Kuo CY. Endothelin-A receptor antagonist prevents neonatal pulmonary hypertension in meconium aspiration in piglets. *J Formos Med Assoc* 2001; **100**: 420-423.

Lahaie, I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F_{2α} on retinal vessels. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998;**274**: R1406-R1416.

Lane P, Gross S. Hemoglobin as a chariot for NO bioactivity. *Nat Med* 2002;**8**:657-658.

Larrue B, Jaillard S, Lorthioir M, Roubliova X, Butrous G, Rakza T, Warembourg H, Storme L. Pulmonary vascular effects of sildenafil on the development of chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Jan 28; versión electrónica, pendiente de impresión.

Laubscher B, Greenough A, Kavvadia V, Devane SP. Response to nitric oxide in term and preterm infants. *Eur J Pediatr* 1997; **156**: 639-642.

Lebidois J, Soifer SJ, Clyman RI, Heymann MA. Piriprost: a putative leukotriene synthesis inhibitor increases pulmonary blood flow in fetal lambs. *Pediatr Res* 1987; **22**:350-354.

Leffler CW, Tyler TL, Cassin S. Responses of pulmonary and systemic circulations of perinatal goats to prostaglandin F₂ alpha. *Can J Physiol Pharmacol* 1979; **57**:167-173.

Leffler CW, Hessler JR, Terragno NA. Ventilation-induced release of prostaglandinlike material from fetal lungs. *Am J Physiol* 1980; **238**: 282-286.

Leffler CW, Hessler JR, Green RS. Mechanism of stimulation of pulmonary prostacyclin synthesis at birth. *Prostaglandins*. 1984a; **28**:877-887.

Leffler CW, Mitchell JA, Green RS. Cardiovascular effects of leukotrienes in neonatal piglets. Role in hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Circ Res* 1984b; **55**:780-787.

Levin DL, Heymann MA, Kitterman JA, Gregory GA, Phibbs RH, Rudolph AM. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1976; **89**:626-633.

Levin DL, Fixler DE, Morriss FC, Tyson J. Morphologic analysis of the pulmonary vascular bed in infants exposed in utero to prostaglandin synthetase inhibitors. *J Pediatr* 1978a; **92**:478-483.

Levin DL, Hyman AI, Heymann MA, Rudolph AM. Fetal hypertension and the development of increased pulmonary vascular smooth muscle: a possible mechanism for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1978b; **92**:265-269.

Levy M, Tulloh RM, Komai H, Stuart-Smith K, Haworth SG. Maturation of the contractile response and its endothelial modulation in newborn porcine intrapulmonary arteries. *Pediatr Res* 1995; **38**:25-29.

Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994; **77**:1451-1459.

Li J, Billiar TR. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol* 2000; **24**: 46-50.

Liben S, Stewart T, De Marte J, Perreault T. Ontogeny of big-endothelin-1 effects in newborn piglet pulmonary vasculature. *Am J Physiol* 1993; **265**: 139-145.

Lippton, HL, Cohen GA, McMurtry IF, Hyman AL. Pulmonary vasodilation to endothelin isopeptides in vivo is mediated by potassium channel activation. *J Appl Physiol* 1991; **70**: 947-952 .

Littler CM, Morris KG Jr, Fagan KA, McMurtry IF, Messing RO, Dempsey EC. Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**: 1321-1331.

MacKenzie A, Martin W. Loss of endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta by oxidant stress: restoration by superoxide dismutase mimetics. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 719-728.

Macrae DJ, Field D, Mercier JC, Møller J, Stiris T, Biban P, Cornick P, Goldman A, Gothberg S, Gustafsson LA, Hammer J, Lonnqvist PA, Sanchez-Luna M, Sedin G, Subheda Nr. Inhaled nitric oxide therapy in neonates and children: reaching a European consensus Intensive. *Care Med* 2004; **30**:372-380.

Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; **263**: 384-393.

Maguire JJ, Johnson CM, Mockridge JW, Davenport AP. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1997; **122**:1647-1654.

Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A: Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F_{2α} in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998;**97**:1536-1539.

Marinoni E, Di Iorio R, Alo P, Villaccio B, Alberini A, Cosmi EV. Immunohistochemical localization of adrenomedullin in fetal and neonatal lung. *Pediatr Res* 1999;**45**:282-528.

Marley, R, Harry D, Anand R, Fernando B, Davies S, and Moore K. 8-isoprostaglandin F_{2α}, a product of lipid peroxidation, increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1997;**112**: 208-213.

Martin D, Weise A, Niclas HJ. The solvent dimethyl sulfoxide. *Angew Chem Int Ed Engl* 1967;**6**:318-334.

Masaki T. The discovery, the present state, and the future prospects of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;**13**: 1-4.

Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**:911–922.

Matsumura Y, Hisaki K, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 1990; **185**:103-106.

Matsushita T, Hislop AA, Boels PJ, Deutsch J, Haworth SG. Changes in ANP responsiveness of normal and hypertensive porcine intrapulmonary arteries during maturation. *Pediatr Res* 1999;**46**:411-418.

Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter E. Brain nitric oxide synthase in a bioprotein-and flavin –containing multi-functional oxide-reductase. *FEBS* 1991;**288**:187-191.

McCord JM. Oxygen radicals and lung injury. The state of the art. *Chest* 1983;**83**:35-37.

McCormack DG, Barnes PJ, Evans TW. Purinoceptors in the pulmonary circulation of the rat and their role in hypoxic vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1989a; **98**:367-372.

McCormack DG, Barnes PJ, Evans TW. Evidence against a role for platelet-activating factor in hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat. *Clin Sci* 1989b; **77**:439-443.

McDonnell TJ, Wescott JY, Czartolomna J, Voelkel NF. Role of peptidoleukotrienes hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am J Physiol* 1990; **259**:751-758.

McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 2002;**8**:711-717.

McMillan MR, Burnstock G, Haworth SG. Vasodilatation of intrapulmonary arteries to P2-receptor nucleotides in normal and pulmonary hypertensive newborn piglets. *Br J Pharmacol* 1999;**128**:543-548.

McQueston JA, Cornfield DN, McMurtry IF, Abman SH. Effects of oxygen and exogenous L-arginine on EDRF activity in fetal pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1993; **264**: 865-871.

McQueston JA, Kinsella JP, Ivy DD, McMurtry IF, Abman SH. Chronic pulmonary hypertension *in utero* impairs endothelium-dependent vasodilation. *Am J Physiol* 1995; **268**: 288-294.

Meadow W, Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis. Rarely has so little been known by so many about so much. *Clin Perinatol* 1995; **22**:519-536.

Meadow W, Rudinsky B, Bell A, Hipps R. Effects of inhibition of endothelium-derived relaxation factor on hemodynamics and oxygen utilization during group B streptococcal sepsis in piglets. *Crit Care Med* 1995; **23**:705-714.

Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 1999;**104**:805-813.

Mehrabi, RM, Ekmekcioglu C, Tatzber F, Oguogho A, Ullrich R, Morgan A, Tamaddon F, Grimm M, Glogar HD, Sinzinger H. The isoprostane, 8-epi-PGF_{2α}, is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 1999;**43**: 492-499.

Mestan KK, Carlson AD, White M, Powers JA, Morgan S, Meadow W, Schreiber MD. Cardiopulmonary effects of nebulized sodium nitroprusside in term infants with hypoxic respiratory failure. *J Pediatr* 2003;**143**:640-643.

Meyrick B, Niedermeyer ME, Ogletree ML, Brigham KL Pulmonary hypertension and increased vasoreactivity caused by repeated indomethacin in sheep. *J Appl Physiol* 1985; **59**:443-452.

Michel RP, Gordon JB, Chu K. Development of the pulmonary vasculature in newborn lambs: structure-function relationships. *J Appl Physiol* 1991; **70**: 1255-64.

Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004;**37**:1119-11136.

Michoud, E, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vivo effect of 8-epi-PGF_{2α} on retinal circulation in diabetic and non-diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;**59**: 349-355.

Miggin SM, Kinsella BT. Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A₂ receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1998;**1425**:543-559.

Miller SL, Green LR, Peebles DM, Hanson MA, Blanco CE. Effects of chronic hypoxia and protein malnutrition on growth in the developing chick. *Am J Obstet Gynecol* 2002;**186**: 261-267.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 1999; **128**: 1121-1132.

Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; **73**:887-987.

Möbert J, Becker BF, Zahler S, Gerlach E: Hemodynamic effects of isoprostanes (8-isoprostaglandin F_{2α} and E₂) in isolated guinea pig hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;**29**:789-794.

Möbert, J, Becker BF. Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**: 1687-1694,.

Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 1994; **46**: 653-665.

Mohler ER, Franklin MT, Adam LP. Intracellular signaling by 8-epi-prostaglandin F₂ alpha is mediated by thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptors in porcine carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**225**: 915-923.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997;**49**:137-42.

Montine TJ, Beal MF, Cudkowicz ME, O'Donnell H, Margolin RA, McFarland L, Bachrach AF, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD: Increased CSF F₂-isoprostane concentration in probable AD. *Neurology* 1999;**52**:562-565.

Montuschi, P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;**158**:1524-1527.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999a;**160**:216-220.

Montuschi, P, Ciabattoni G, Corradi M, Nightingale J, Collins JV, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane, a new biomarker of oxidative stress in asthma (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1999b;**159**:A97.

Montuschi, P, Currò D, Ragazzoni E, Preziosi P, and Ciabattoni G. Anaphylaxis increases 8-iso-prostaglandin F_{2α} from guinea-pig lung in vitro. *Eur J Pharmacol* 1999c;**365**: 59-64.

Montuschi, P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;**55**: 205-209.

Moore P, Velvis H, Fineman JR, Soifer SJ, Heymann MA. EDRF inhibition attenuates the increase in pulmonary blood flow due to oxygen ventilation in fetal lambs. *J Appl Physiol* 1984; **56**:1340-1346.

Morecroft I, McLean M. Developmental changes in endothelium-dependent vasodilation and the influence of superoxide anions in perinatal rabbit pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 1998; **125**: 1585-93.

Moreno L, Losada B, Cogolludo A, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, Moro M, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediatr Res* 2004;**56**:563-570.

Moreno L, Gonzalez-Luis G, Cogolludo A, Lodi F, Lopez-Farre A, Tamargo J, Villamor E, Perez-Vizcaino F. Soluble guanylyl cyclase during postnatal porcine pulmonary maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;**288**:125-130.

Morganroth ML, Reeves JT, Murphy CR, Voelkel NF. Leukotriene synthesis and receptor blockers block hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 1984; **56**:1340-1346.

Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, Puddey IB. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F₂-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999; **48**:1402-1408.

Morin FC, Egan EA, Ferguson W, Lundgren CEC. Development of pulmonary vascular response to oxygen. *Am J Physiol* 1988;**254**: 542-546.

Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995; **270**:10902-10908.

Morisset S, Patry C, Lora M, de Brum-Fernandes AJ. Regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in culture by interleukin-1 α , tumor necrosis factor α , glucocorticoids and 17 β -estradiol. *J Rheumatol* 1998; **25**: 1146-1153.

Moro M, Villamor E, Ruiz T, Pérez-Vizcaíno F, Arizcun J, Tamargo J. Etiopatogenia de la Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN). *An Esp Pediatr* 1995;**73**: 40-49.

Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanos: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;**36**:1-21.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radicalcatalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990a;**87**: 9383–9387.

Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ II. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990b;**184**:1-10

Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ 2nd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:10721-10725.

Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA , Roberts LJ II. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo: Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994; **269**:4317-4326.

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxydation (F₂-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995;**332**:1198-1203.

Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zackert WE, Awad JA, Roberts LJ. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 1999; **31**: 117-139.

Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005;**98**:390-403.

Murphy, JD, Aronovitz MJ, Reid LM. Effects of chronic in utero hypoxia on the pulmonary vasculature of the newborn guinea pig. *Pediatr Res* 1986;**20**:292-295.

Murphy RC. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of epoxygenase-derived eicosanoids. *Pharmacol Rev* 1989; **40**:229-241.

Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; **3**:457-465.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiological Reviews* 1999;**79**: No. 4.

Nankervis CA, Dunaway DJ, Nowicki PT. Determinants of terminal mesenteric artery resistance during the first postnatal month. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001a ;**280**: 678-686.

The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group (NINOS). Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med* 1997; **336**: 597-604.

Nicholson PA. A review of the therapeutic efficacy of misoprostol, a prostaglandin E1 analogue. *S Afr Med J* 1988; **2**:56-58.

Nusing, RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, Narumiya S. *J Biol Chem* 1993;**268**:25253-25259.

Obata T, Tomaru K, Nagakura T, Izumi Y, Kawamoto T. Smoking and oxidant stress: assay of isoprostane in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;**746**:11-15.

O'donovan DJ, Fernandes C. Free Radicals and Diseases in Premature Infants. Antioxidants & Redox signalling. Vol6, Number 1, 2004.

Oguogho A, Lupattelli G, Palumbo B, Sinzinger H. Isoprostanes quickly normalize after quitting cigarette smoking in healthy adults. *Vasa* 2000;**29**:103-105.

Okazawa A, Kawikova I, Cui ZH, Skoogh BE, Lotvall J. 8-Epi-PGF2alpha induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;**155**:436-441.

Okogbule-Wonodi AC, Ibe BO, Yue BW, Hsu S, Raj JU. Phosphodiesterase activity in intrapulmonary arteries and veins of perinatal lambs. *Mol Genet Metab* 1998;**65**:229-237.

Oliveira L, Stallwood NA, Crankshaw DJ. Effects of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 2000;**129**:509-514.

Palmer RM, FerrigeAG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)* 1987; **327**: 524-526.

Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**158**:348-352.

Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:2309-2315.

Pearson DL, Dawling S, Walsh WF, Haines JL, Christman BW, Bazyk A, Scott N, Summar ML. Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *N Engl J Med* 2001;**344**:1832-1838.

Pedraz C. Estrés oxidativo en el periodo neonatal. Prevención y tratamiento. *RELAN* 1999; **1**: 158-169.

Peiro C, Vallejo S, Cercas E, Llergo JL, Lafuente N, Matesanz N, Rodriguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF. Thapsigargin induces apoptosis in cultured human aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Nov; **36**:676-680.

Pérez Vizcaíno F, Duarte J, Tamargo J. Effects of flecainide on isolated vascular smooth muscle on rat. *Br J Pharmacol* 1991; **104**: 103-107.

Pérez Vizcaíno F, Carrón R, Delpón E, Duarte J, Tamargo J. Effects of (S)-nafenedone on 45Ca^{2+} fluxes and contractions in rat isolated vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993; **232**: 105-111.

Pérez-Vizcaino F, Villamor E, Fernández del Pozo B, Moro M, Tamargo J. Lack of endotoxin induced hyporesponsiveness to U46619 in isolated neonatal porcine pulmonary but not mesenteric arteries. *J Vasc Res* 1996a; **33**: 249-257.

Pérez-Vizcaino F, Villamor E, Moro M, Tamargo J. Pulmonary versus systemic effects of vasodilator drugs: an in vitro study in isolated intrapulmonary and mesenteric arteries of neonatal piglets. *Eur J Pharmacol* 1996b; **314**: 91-98.

Pérez-Vizcaino F, Villamor E, Fernández del Pozo B, Moro M, Tamargo J. Lack of endotoxin-induced hyporesponsiveness to U46619 in isolated neonatal porcine pulmonary but not mesenteric arteries. *J Vasc Res* 1996c; **33**: 249-257.

Pérez-Vizcaino F, Villamor E, Duarte J, Tamargo J. Involvement of protein kinase C in reduced relaxant responses to the NO/cyclic GMP pathway in piglet pulmonary arteries contracted by the thromboxane A_2 -mimetic U46619. *Br J Pharmacol* 1997; **121**: 1323-1333.

Pérez-Vizcaíno F, Cogolludo A, Ibarra M, Fajaro S, Tamargo J. Pulmonary artery vasoconstriction but not $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signal stimulated by thromboxane A_2 is partially resistant to NO. *Pediatr Res* 2001; **50**: 508-514.

Pérez-Vizcaíno F, López-López G, Santiago R, Cogolludo A, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, Alonso MJ, Salaíces M, Tamargo J. Postnatal maturation in nitric oxide-induced pulmonary artery relaxation involving cyclooxygenase-1 activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; **283**: 839-848.

Perreault T, Baribeau J, Gosselin R, Gutkowska J. Reduced vasodilator response to ANF in hypoxia-induced pulmonary hypertension in the newborn piglet. *Am J Physiol* 1997a; **273**:L289-L295.

Perreault T, Baribeau J, Gutkowska J. ANF system in the newborn piglet pulmonary vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997b; **29**:740-746.

Perreault T, Berkenbosch JW, Barrington KJ, Decker ER, Wu C, Brock TA, Baribeau J. TBC3711, an ET(A) receptor agonist, reduces neonatal hypoxia induced pulmonary hypertension in piglets. *Pediatr Res* 2001; **50**: 374-383.

Phillips ML, Hall TA, Sekar K, Tomey JL. Assessment of medical personnel exposure to nitrogen oxides during inhaled nitric oxide treatment of neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* 1999; **104**:1095-1100.

Plumpton C, Ashby MJ, Kuc RE, O'Reilly G, Davenport AP. Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. *Clin Sci (Colch)* 1996;**90**:37-46.

Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;**36**:403-427.

Popescu LM, Panoiu C, Hinescu M, Nutu O. The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1985a;**107**:393-394.

Popescu LM, Foril CP, Hinescu M, Panoiu C, Cinteza M, Gherasim L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca⁺⁺-extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1985b; **34**:1857-1860.

Praticò D, Lawson JA, Fitzgerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F₂ alpha. *J Biol Chem* 1995;**270**:9800-9808.

Praticò D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, Maclouf J, Violi F, FitzGerald GA. Localization of distinct F₂-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;**100**: 2028-2034.

Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, FitzGerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F₂alpha-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998a;**158**:1709-1717.

Praticò D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang SW, Khanapure SP, Iuliano L, Rokach J, FitzGerald GA. IPF₂alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998b;**95**: 3449-3454.

Pratico D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* 2001 ;**12**:243-247.

Qin Y, Wang CC, Kuhn H, Rathmann J, Pang CP, Rogers MS. Determinants of umbilical cord arterial 8-iso-prostaglandin F₂alpha concentrations. *BJOG* 2000; **107**:973-981.

Raal FJ, Pilcher GJ, Waisberg R, Buthelezi EP, Veller MG, Joffe BI: Low-density lipoprotein cholesterol bulk is the pivotal determinant of atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1999;**83**:1330-1333.

Radi R. Biological antioxidant defenses. *Toxicol Health* 1993; **9**: 53-62.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:5193-5197.

Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1380-1382.

Rairigh RL, Le Cras TD, Ivy DD, Kinsella JP, Richter G, Horan MP, Fan ID, Abman SH. Role of inducible nitric oxide synthase in regulation of pulmonary vascular tone in the late gestation ovine fetus. *J Clin Invest* 1998 ;**101**:15-21.

Rairigh RL, Storme L, Parker TA, le Cras TD, Markham N, Jakkula M, Abman SH. Role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of vascular and ductus arteriosus tone in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **278**: 105-110.

Raj JU, Hillyard R, Kaapa P, Gropper M, Anderson J. Pulmonary arterial and venous constriction during hypoxia in 3- to 5-wk-old and adult ferrets. *J Appl Physiol* 1990;**69**:2183-2189.

Raj U, Shimoda L. Oxygen-dependent signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;**283**: 671-677.

Rasanen J, Wood DC, Debbs RH, Cohen J, Weiner S, Huhta JC. Reactivity of the human fetal pulmonary circulation to maternal hyperoxygenation increases during the second half of pregnancy: a randomized study. *Circulation* 1998; **97**:257-262.

Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC, Ware JA. *J Biol Chem* 1994; **269**:19256-19261.

Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent K C, Ware J A. Additions and Corrections to Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A₂ receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**:7011.

Reber KM, Su BY, Clark KR, Pohlman DL, Miller CE, Nowicki PT. Developmental expression of eNOS in postnatal swine mesenteric artery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**283**: 1328-1335.

Reber KM, Nowicki PT. Pressure and flow characteristics of terminal mesenteric arteries in postnatal intestine. *Am J Physiol* 1998;**274**: 290-298.

Reilly M, Delanty N, Lawson JA, Fitzgerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996;**94**:19-25.

Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, Fitzgerald GA. Increased formation of distinct F₂ isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;**98**:2822-2828.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;**101**:746-752.

Reeve HL, Weir EK, Archer SL, Cornfield DN. A maturational shift in pulmonary K⁺ channels, from Ca²⁺ sensitive to voltage dependent. *Am J Physiol* 1998;**275**:1019-1025.

Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Metairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett* 1999;**459**:259-262.

Rodrigues FPM. Importância dos radicais livres de oxigênio no período neonatal. *J pediatr (Rio J)* 1998;**74**:91-98.

Roberts JD, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. *Semin Perinatol* 2000; **24**: 55-58.

Roberts LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997;**1345**:121-135.

Roberts LJ, Reckelhoff JF. Measurement of F₂-isoprostanes unveils profound oxidative stress in aged rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**287**:254-256.

Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* 1997;**54**: 823-851.

Rosenberg AA, Kennaugh J, Koppenhafer SL, Loomis M, Chatfield BA, Abman SH. Elevated immunoreactivity endothelin-1 levels in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1993;**14**:109-114.

Rosenzweig EB, Widlitz AC, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol* 2004;**38**:2-22.

Roze JC, Storme L, Zupan V, Morville P, Dinh-Xuan AT, Mercier JC. Echocardiographic investigation of inhaled nitric oxide in newborn babies with severe hypoxaemia. *Lancet* 1994; **344**: 303-305.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol (Lond)* 1985; **364**: 45-56.

Rudolph AM, Heymann MA. The fetal circulation. *Annu Rev Med.* 1968; **19**:195-206.

Ruijtenbeek, K, le Noble FA, Janssen GM, Kessels CG, Fazzi GE, Blanco CE, De Mey JG. Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryo. *Circulation* 2000;**102**: 2892-2897.

Ruijtenbeek, K, De Mey JG, Blanco CE. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;**283**:549-550.

Ruijtenbeek, K, Kessels LC, De Mey JG, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo. *Pediatr Res* 2003a;**53**:573-579.

Ruijtenbeek, K, Kessels CG, Janssen BJ, Bitsch NJ, Fazzi GE, Janssen GM, De Mey J, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens. *Pflugers Arch* 2003b;**447**:158-167.

Runkle B, Goldberg RN, Streitfeld MM, Clark MR, Buron E, Setzer ES, Bancalari E. Cardiovascular changes in group B streptococcal sepsis in the piglet: response to indomethacin and the relationship to prostacyclin and thromboxane A₂. *Pediatr Res* 1984; **18**:874-878.

Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan US, Kimura S, Goto K, Masaki. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;**175**:44-47.

Sametz W, Grobuschek T, Hammer-Kogler S, Juan H, Wintersteiger R: Influence of isoprostanes on vasoconstrictor effects of noradrenaline and angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 1999;**378**:47-55.

Sametz W, Hennerbichler S, Glaser S, Wintersteiger R, Juan H: Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE₂ and 8-iso-PGF_{2α} in some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 2000;**130**:1903-1910.

Sánchez Luna J, Valls-i-Soler A, Moreno Hernando J. Oxigenación por Membrana Extracorpórea (ECMO). Indicaciones y guías para el contacto con una unidad de ECMO. *An Esp Pediatr* 2002;**57**:51-54.

Sánchez-Esteban J.Utilización del óxido nítrico en la prematuridad: comentario. *De guardia en Neonatología*. 2003b. Ed: Ergon. ISBN: 84-8473-213-4.

Sarabi M, Vessby B, Basu S, Millgard J, Lind L. Relationships between endothelium-dependent vasodilation, serum vitamin E and plasma isoprostane 8-iso-PGF_{2α} levels in healthy subjects. *J Vasc Res* 1999;**36**:486-491.

Sartori C, Allemann Y, Trueb L, Delabays A, Nicod P, Scherrer U. Augmented vasoreactivity in adult life associated with perinatal vascular insult. *Lancet* 1999;**353**: 2205-2207.

Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr* 1996;**85**:1-4.

Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001;**13**:147-153.

Schmalfuss CM, Chen LY, Bott JN, Staples ED, Mehta JL. Superoxide anion generation, superoxide dismutase activity, and nitric oxide release in human internal mammary artery and saphenous vein segments. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 1999;**4**:249-257.

Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW. Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;**81**:876-883.

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Kauser S, Masferrer J, Ikakson P. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol* 1997; **400A**: 167-170.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res* 1994;**74**: 349-353.

Shaul PW, Kinane B, Farrar MA, Buja LM, Magness RR. Prostacyclin production and mediation of adenylate cyclase activity in the pulmonary artery. Alterations after prolonged hypoxia in the rat. *J Clin Invest* 1991; **88**:447-455.

Shaul PW, Farrar MA, Zellers TM. Oxygen modulates endothelium-derived relaxing factor production in fetal pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1992; **262**: 355-364.

Shaul PW, Farrar MA, Magness RR. Oxygen modulation of pulmonary arterial prostacyclin synthesis is developmentally regulated. *Am J Physiol* 1993b; **265**: 621-628.

Shaul PW, Wells LB, Horning KM. Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993a; **22**:819-827.

Shaul PW, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Steinhorn RH, Morin FC 3rd. Pulmonary endothelial NO synthase gene expression is decreased in fetal lambs with pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1997; **272**: 1005-1012.

Shaul PW, Pace MC, Chen Z, Brannon TS. Developmental changes in prostacyclin synthesis are conserved in cultured pulmonary endothelium and vascular smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **20**:113-121.

Sinzinger H. Eicosanoid production and lymphatic responsiveness in human cigarette smokers compared with non-smokers. *Lymphology* 2000;**33**:24-31.

Smith WL, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; **62**:167-215.

Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;**107**:1491-1495.

Smith GCS. The Pharmacology of the Ductus Arteriosus. *Pharmacological Reviews* 1998;**50**:35-58.

Soifer SJ, Morin F, Kaslow D, Heymann M. The developmental effects of PGD₂ on the pulmonary and systemic circulations in the newborn lamb. *J Dev Physiol* 1983; **5**: 23-27.

Soifer SJ, Loitz RD, Roman C, Heymann MA. Leukotriene end organ antagonists increase pulmonary blood flow in fetal lambs. *Am J Physiol*. 1985; 249: 570-6.

Soifer SJ, Kaslow D, Roman C, Heymann MA. Umbilical cord compression produces pulmonary hypertension in newborn lambs: a model to study the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension in the newborn. *J Dev Physiol* 1987;**9**: 239-252.

Soll RF, Dargaville P. Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;**2**:CD002054.

Somlyo, AP, and Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol (Lond)* 2000;**522**:177-185.

Soukka H, Viinikka L, Kaapa P. Involvement of thromboxane A₂ and prostacyclin in the early pulmonary hypertension after porcine meconium aspiration. *Pediatr Res* 1998; **44**:838-842.

Staff, AC, Halvorsen B, Ranheim T, Henriksen T. Elevated level of free 8-iso-prostaglandin F_{2α} in the decidua basalis of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;**181**:1211-1215.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;**86**:915-924.

Steinhorn RH, Morin FC III, Gugino SF. Developmental differences in endothelium-dependent responses in isolated ovine pulmonary arteries and veins. *Am J Physiol* 1993; **264**: 2162-217.

Steinhorn RH, Russell JA, Morin FC. Disruption of cGMP production in pulmonary arteries isolated from fetal lambs with pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1995a; **268**: 1483-1489.

Steinhorn RH, Millard SL, Morin FC 3rd. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. Role of nitric oxide and endothelin in pathophysiology and treatment. *Clin Perinatol* 1995b; **22**:405-428.

Steinhorn RH, Morin FC 3rd, Fineman JR. Models of persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) and the role of cyclic guanosine monophosphate (GMP) in pulmonary vasorelaxation. *Semin Perinatol* 1997;**21**: 393-408.

Steinhorn RH, Albert G, Swartz DD, Russell JA, Levine CR, Davis JM. Recombinant human superoxide dismutase enhances the effect of inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**164**:834-839.

Stenmark KR, James SL, Voelkel NF, Toews WH, Reeves JT, Murphy RC. Leukotriene C₄ and D₄ in neonates with hypoxemia and pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1983; **309**:77-80.

Stock G, Muller B, Kraus T, Schillinger E. Iloprost, a stable analogue of PGI₂: clinical results and pathophysiological considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;**21B**:583-589.

Stuehr D, Gross S, Sakuma I, Levi R, Nathan C. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989;**169**:1011-1020.

Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;**168**:558-565.

Su BY, Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Development of the myogenic response in postnatal intestine: role of PKC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;**284**:445-452.

Summar ML, Gainer JV, Pretorius M, Malave H, Harris S, Hall LD, Weisberg A, Vaughan DE, Christman BW, Brown NJ. Relationship between carbamoyl-phosphate synthetase genotype and systemic vascular function. *Hypertension* 2004;**43**:186-191.

Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ. A nomenclature system for the isoprostanos. *Prostaglandins* 1997;**53**:63-67.

Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, and Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, in the rat: evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest* 1992;**90**: 136-141.

Takahashi Y, de Vroomen M, Gournay V, Roman C, Rudolph AM, Heymann MA. Mechanisms of adrenomedullin-induced increase of pulmonary blood flow in fetal sheep. *Pediatr Res* 1999;**45**:276-281.

Tang, JR, Le Cras TD, Morris KG Jr, Abman SH. Brief perinatal hypoxia increases severity of pulmonary hypertension after reexposure to hypoxia in infant rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;**278**: 356-364.

Tazzeo T, Miller J, Janssen LJ. Vasoconstrictor responses, and underlying mechanisms, to isoprostanos in human and porcine bronchial arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;**140**:759-763.

Teitel DF, Iwamoto HS, Rudolph AM. Changes in the pulmonary circulation during birth-related events. *Pediatr Res* 1990; **27**:372-378.

Terragno NA, Terragno A. Prostaglandin metabolism in the fetal and maternal vasculature. *Fed Proc* 1979;**38**:75-77.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol* 2000; **279**:1005-1028.

Thompson LP, Weiner CP. Endothelium-derived relaxing factor inhibits norepinephrine contraction of fetal guinea pig arteries. *Am J Physiol* 1993;**264**: 1139-1145.

Tiktinsky M.H., Morin FC. Increasing oxygen tension dilates fetal pulmonary circulation via endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1993;**265**: 376-380.

Tod ML, Cassin S. Endothelin-1-induced pulmonary arterial dilation is reduced by Nomega-nitro-L-arginine in fetal lambs. *J Appl Physiol* 1992; **72**:1730-1734.

Toga H, Raj JU, Hillyard R, Ku B, Anderson T. Endothelin effects in isolated perfused lamb lungs: role of cyclooxygenase inhibition and vasomotor tone. *Am J Physiol* 1991; **261**: 443-450.

Touyz R. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000; **2**:98-105.

Travadi JN, Patole SK. Phosphodiesterase inhibitors for persistent pulmonary hypertension of the newborn: a review. *Pediatr Pulmonol* 2003;**36**:529-535.

Truog WE, Sorensen GK, Standaert TA, Redding GJ. Effects of the thromboxane synthetase inhibitor, dazmegrel (UK 38,485), on pulmonary gas exchange and hemodynamics in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1986; **20**:481-486.

Truog WE, Norberg M, Thibeault DW. Effects of 8-epi-prostaglandin F2 alpha and U46619 on pulmonary hemodynamics in piglets. *Biol Neonate* 1997; **71**:306-316.

Truog WE, Pallotto E, Clark P, Banks B, Kaftan HA, Ekekezie II, Norberg M, Ballard RA. Interaction of endogenous endothelin-1 and inhaled nitric oxide in term and preterm infants. *Clin Sci (Lond)* 2002;**103**:294-297.

Tsai BM, Wang M, Pitcher JM, Meldrum KK, Meldrum DR. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery tissue cytokine expression are mediated by protein kinase C. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;**287**: 1215-1219.

Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, Bairaktari E, Goudevenos JA, Chapman MJ, Elisaf M, Tselepis AD. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:306-311.

Tsukahara Y, Matsumura Y, Kuninobu K, Kojima T, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme in cultured vascular smooth muscle cells converts big endothelin-3 to endothelin-3. *Life Sci* 1993; **53**:465-471.

Turbow R, Waffarn F, Yang L, Sills J, Hallman M. Variable oxygenation response to inhaled nitric oxide in severe persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Acta Paediatr* 1995; **84**: 1305-1308.

Twort CH, van Breemen C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum vascular smooth muscle. *Circ Res* 1988; **62**:961-964.

UK collaborative randomised trial of neonatal extracorporeal membrane oxygenation. UK Collaborative ECMO Trail Group. *Lancet* 1996;**348**:75-82.

Ungrin MD, Carriere MC, Denis D, Lamontagne S, Sawyer N, Stocco R, Tremblay N, Metters KM, Abramovitz M. Key structural features of prostaglandin E(2) and prostanoid analogs involved in binding and activation of the human EP(1) prostanoid receptor. *Mol Pharmacol* 2001;**59**:1446-1456.

Vacchiano CA, Tempel GE. Role of nonenzymatically generated prostanoid, 8-iso-PGF_{2α}, in pulmonary oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 1994;**77**:2912-2917.

Vacchiano CA, Osborne GR, Temple GE. 8-iso-PGF_{2α} production by alveolar macrophages exposed to hyperoxia. *Shock* 1998;**9**: 266-273.

Vanheel B, Calders P, Van den Bossche I, Van de Voorde J. Influence of some phospholipase A2 and cytochrome P450 inhibitors on rat arterial smooth muscle K⁺ currents. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;**77**:481-489.

Van Marter LJ, Leviton A, Allred EN, Pagano M, Sullivan KF, Cohen A, Epstein MF. Persistent pulmonary hypertension of the newborn and smoking and aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drug consumption during pregnancy. *Pediatrics* 1996;**97**:658-663.

Van Kooten F, Ciabattini G, Patrono C, Dippel DW, Koudstaal PJ. Platelet activation and lipid peroxidation in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 1997;**28**:1557-1563.

Velvis H, Moore P, Heymann MA. Prostaglandin inhibition prevents the fall in pulmonary vascular resistance as a result of rhythmic distension of the lungs in fetal lambs. *Pediatr Res* 1991;**30**:62-68.

Villamor E, Pérez-Vizcaino F, Ruiz T, Leza JC, Moro M, Tamargo J. Group B Streptococcus and E coli LPS-induced NO-dependent hyporesponsiveness to noradrenaline in isolated intrapulmonary arteries of neonatal piglets. *Br J Pharmacol* 1995; **115**:261-266.

Villamor E, Pérez-Vizcaino F, Tamargo J, Moro M. Effects of group B Streptococcus on the responses to U46619, endothelin-1 and noradrenaline in isolated pulmonary and mesenteric arteries of piglets. *Pediatr Res* 1996a; **40**: 827-833.

Villamor E, Pérez-Vizcaino F, Ruiz T, Tamargo J, Moro M. In vitro effects of magnesium sulfate in isolated intrapulmonary and mesenteric arteries of piglets. *Pediatr Res* 1996b; **39**:1107-11012.

Villamor E, Ruiz T, Pérez-Vizcaino F, Tamargo J, Moro M. Endothelium-derived nitric oxide-dependent response to hypoxia in piglet intrapulmonary arteries. *Biol Neonate* 1997; **72**:62-70.

Villamor E, Le Cras T, Horan M, Halbower A, Tudor R, Abman S. Chronic intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelial nitric oxide synthase in the ovine fetus. *Am J Physiol* 1997b; **272**: 1013-1020.

Villamor E. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. Role of nitric oxide in its pathophysiology. *Developmental Physiopathology and Clinics* 1999; **9S**:129-131.

Villamor E, Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Conde-Oviedo J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez JG, Tamargo J. Relaxant effects of carbon monoxide compared with nitric oxide in pulmonary and systemic vessels of newborn piglets. *Pediatr Res* 2000; **48**:546-553.

Villamor E. Persistent Pulmonary Hipertensión of the Newborn. A Point of View from Vascular Pharmacology. 2001. ISBN 90-5681-107-X.

Villamor E, Kessels CG, Fischer MA, Bast A, de Mey JG, Blanco CE. Role of superoxide anion on basal and stimulated nitric oxide activity in neonatal piglet pulmonary vessels. *Pediatr Res* 2003a; **54**:372-381.

Villamor E, Moro M. Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal. *De guardia en Neonatología*. 2003b. Ed: Ergon. ISBN: 84-8473-213-4.

Villamor E, Kessels CGA, Ruijtenbeek K, van Suylen RJ, Belik J, De Mey JGR, Blanco CE. Chronic *in ovo* hypoxia decreases pulmonary arterial contractile reactivity and induces biventricular cardiac enlargement in the chicken embryo. *Am J Physiol Regul Interg Comp Physiol* 2004; **287**: 642-651.

Villamor E, Kessels CGA, Van Suylen RJ, De Mey JGR, Blanco CE. Cardiopulmonary effects of chronic administration of the NO synthase inhibitor L-NAME in the chick embryo. *Biol Neonate* 2005; **3**; **88**:156-163.

Villanueva ME, Zaher FM, Svinarich DM, Konduri GG. Decreased gene expression of endothelial nitric oxide synthase in newborns with persistent pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 1998; **44**:338-343.

Vincent JA, Ross RD, Kassab J, Hsu JM, Pinsky WW. Relation of elevated plasma endothelin in congenital heart disease to increased pulmonary blood flow. *Am J Cardiol* 1993; **71**:1204-1207.

Vosatka RJ, Kashyap S, Trifiletti RR. Arginine deficiency accompanies persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Biol Neonate* 1994; **66**:65-70.

Voutilainen S, Morrow JD, Roberts II LJ, Alftan G, Alho H, Nyssonen K, Salonen JT: Enhanced *in vivo* lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**:1263-1266.

Wagner, RS, Weare C, Jin N, Mohler ER, and Rhoades RA. Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin(PG)F2 alpha in rat aortic rings. *Prostaglandins* 1997; **54**:581-599.

Walch L, Labat C, Gascard JP, De Montpreville V, Dulmet E, Brink C. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. *Br J Pharmacol* 1999; **126**:859-866.

Walker AM. Circulatory transition at birth and the control of neonatal circulation. In Hanson MA, Spencer JAD, Rodeck CH (eds.): fetus and neonate physiology and clinical applications. *The Circulation* Cambridge University Press 1993;**1**:160-196.

Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics* 2000;**105**:14-20.

Wang Y, Coceani F. Isolated pulmonary resistance vessels from fetal lambs. Contractile behavior and responses to indomethacin and endothelin-1. *Circ Res* 1992; **71**:320-330.

Ward JP, Knock GA, Snetkov VA, Aaronson PI. Protein kinases in vascular smooth muscle tone--role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther* 2004;**104**:207-231.

Watkins MT, Patton GM, Soler HM, Albadawi H, Humphries DE, Evans JE, Kadowaki H. Synthesis of 8-epi-prostaglandin F₂α by human endothelial cells: role of prostaglandin H₂ synthase. *Biochem J* 1999;**344**:747-754.

Weiner, C. P., Lizasoain, I., Baylis, S. A., Knowles, R. G., Charles, I. G Moncada, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:5212-5216.

Weir EK, McMurtry IF, Tucker A, Reeves JT, Grover RF. Prostaglandin synthetase inhibitors do not decrease hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 1976;**41**: 714-718.

Wilson SH, Best PJ, Lerman LO, Holmes DR Jr., Richardson DM, Lerman A. Enhanced coronary vasoconstriction to oxidative stress product, 8-epi-prostaglandin F₂α, in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res* 1999; **44**:601-607.

Winer J. Indomethacin. *Schweiz Med Wochenschr* 1966;**96**:1759-1760.

Winters JW, Wong J, Van Dyke D, Johengen M, Heymann MA, Fineman JR. Endothelin receptor blockade does not alter the increase in pulmonary blood flow due to oxygen ventilation in fetal lambs. *Pediatr Res* 1996; **40**:152-157.

Wong J, Vanderford PA, Fineman JR, Chang R, Soifer SJ. Endothelin-1 produces pulmonary vasodilation in the intact newborn lamb. *Am J Physiol* 1993; **265**:1318-1325.

Wong J, Fineman JR, Heymann MA. The role of endothelin and endothelin receptor subtypes in regulation of fetal pulmonary vascular tone. *Pediatr Res* 1994; **35**:664-670.

Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000;**35**:967-974.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;**332**:411-415.

Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. Altered expression of ETB-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **22**: 336-338.

Young JD, Dyar OJ. Delivery and monitoring of inhaled nitric oxide. *Intensive Care Med* 1996; **22**:77-86.

Yu, AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 1998;**275**: 818-826.

Yura T, Fukunaga M, Grygorczyk R, Makita N, Takahashi K, Badr KF. Molecular and functional evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995;**23**:237-239.

Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A. Free radical-generated F₂-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int* 1999;**56**: 471-478.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2692-2696.

Zellers TM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations of piglet pulmonary arteries augment with maturation. *Pediatr Res* 1991; **30**: 176-180.

Zayek M, Cleveland D, Morin FC 3rd. Treatment of persistent pulmonary hypertension in the newborn lamb by inhaled nitric oxide. *J Pediatr* 1993; **122**: 743-50.

Zayek M, Cleveland D, Morin FC. Treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn lamb by inhaled NO. *J Pediatr* 1995;**122**:743-750.

Zhang R, Ogletree ML, Moreland S. Characterization of thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptors in aorta. *Eur J Pharmacol*. 1996;**317**:91-96.

Zhang Y, Tazzeo T, Hirota S, Janssen LJ. Vasodilatory and electrophysiological actions of 8-iso-prostaglandin E₂ in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**305**:1054-1060.

Ziegler JW, Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of the pulmonary circulation. *Clin Perinatol* 1995a; **22**:387-403.

Ziegler JW, Ivy DD, Fox JJ, Kinsella JP, Clarke WR, Abman SH. Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol* 1995b; **269**:473-479.

Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery* 1998; **43**:863-875.