Investigación Básica

Menores niveles circulantes del péptido vasoactivo y cardioprotector angiotensina-(1-9) en pacientes con hipertension arterial pulmonar

María Paz Ocaranza, Fernando Baraona, Luigi Gabrielli, Jackeline Moya, Jorge Jalil, Hugo Verdejo, Pablo Castro.

División Enfermedades Cardiovasculares, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Financiamiento: Fondef D1111122 (MPO, JJ), Fondecyt 1141198 (PC, HV, LG). Fondap 15130011 (MPO, PC, HV, LG).

Grant Puente-Pontificia Universidad Católica de Chile P1705/2017 (MPO), Bayer AG, Program Grants4Targets ID 2017-08-2260 (MPO).

Recibido el 11 de julio 2019 / Aceptado el 12 de agosto 2019

Rev Chil Cardiol 2019; 38: 96-106

Introducción: La vía clásica del sistema renina-angiotensina (SRA) está activado en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (HAP). Previamente, hemos encontrado que en la disfunción ventricular post infarto al miocardio experimental la activación del eje clásico del SRA, dado por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y angiotensina (Ang) II se correlaciona negativamente con el eje paralelo del SRA dado por la ECA homóloga (ECA2) y el péptido vasoactivo y cardioprotector Ang-(1-9). Resultados preclínicos muestran la eficacia de la administración de Ang-(1-9) en el tratamiento del remodelamiento cardiovascular patológico. Hasta la fecha no existen antecedentes de los niveles circulantes de Ang-(1-9) en pacientes con hipertensión arterial pulmonar comparados con sujetos sanos.

Objetivo: Determinar los niveles circulantes del péptido vasoactivo y cardioprotector Ang-(1-9) en pacientes con HAP y compararlos con sujetos sanos pareados por edad y sexo.

Métodos: Estudio comparativo transversal en pacientes con HAP (grupo I, OMS) con presión de arteria pulmonar media (mPAP) ≥ 25 mmHg bajo tratamiento con furosemida (40%), espironolactona (53%), Acenocumarol/Warfarina (47%), Bosentan/Ambrisentan (27%), Sildenafil (80%), iloprost (7%) y digoxina (13%). Los sujetos controles correspondieron a sujetos asintomáticos sanos sin enfermedad cardiovascular, cardiopatía estructural ni pulmonar (n=14). En todos los pacientes se determinó mPAP, proBNP, resistencia

vascular pulmonar (RVP, WU), presión capilar pulmonar (PCP, mmHg), gasto cardíaco (L/min), capacidad funcional por test de caminata 6 minutos (TC6M), cambio del área fraccional del ventrículo derecho VD (FAC, %). Se utilizó prueba t de Student y programa estadístico SPSS10.0. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados: Los pacientes ingresados al estudio mostraron: etiología de la HAP, idiopática (86,7%), VIH (13,3%), capacidad funcional I (6,2%), II (68,3) y III (25%) y promedio mPAP $51,3 \pm 1,9$. Pacientes con HAP (grupo I, OMS) versus sujetos sanos mostraron disminución significativa de FAC, actividad plasmática de la ECA2 y niveles circulantes de Ang-(1-9). En la vía clásica del RAAS pacientes con HAP mostraron mayor actividad plasmática de ECA y niveles circulantes e Ag II. Correlaciones significativas se encontraron entre niveles de Ang-(1-9) y mPAP ($r = -0.701$, $p < 0,001$) y Ang-(1-9) vs FAC ($r = 0.549$, $p < 0,01$).

Conclusiones: En pacientes con HAP (grupo I, OMS), los niveles circulantes de Ang-(1-9) están significativamente disminuidos y se asocian inversamente con la PAP, severidad del remodelamiento y disfunción del ventrículo derecho. El uso terapéutico de Ang-(1-9) como agente vasodilatador y cardioprotector podría ser relevante y potencialmente útil, desde una perspectiva clínica, en la HAP. Ang-(1-9) podría reducir la PAP y mejorar el remodelamiento vascular y del ventrículo derecho en la HAP. Por lo tanto, este péptido podría ser útil como blanco terapéutico en la HAP.

Lower circulating levels of Angiotensin-(1-9), a vasoactive and cardio-protective peptide in patients with Pulmonary Artery Hypertension

Classic renin-angiotensin pathway (RAP) is activated in patients with pulmonary artery hypertension (PAH). We have previously shown that in patients with post myocardial infarction systolic dysfunction the activation of RAP mediated by angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin II (Ang II) is inversely correlated with the parallel RAP axis mediated by homologous ACE (ACE2) and by the vasoactive and cardioprotective peptide Ang-(1-9). Pre clinical studies show that administration of Ang-(1-9) leads to a favorable ventricular remodelling. At present there is no information regarding levels of Ang-(1-9) in PAH patients compared to healthy subjects.

Methods. 16 PAH patients (WHO group 1), with mean PA pressure > 25mmHg being treated with furosemide (40%), Bosentan/Ambrisentan (27%), Sildenafil (80%), iloprost (7%) were compared with healthy subjects (n=14). mPAP, pro BNP, pulmonary vascular resistance (Wu), pulmonary capillary pressure (PCP mmHg), cardiac output (L/min), functional

capacity (6 min walking test) (6mWT), and changes in right ventricular fractional area (RV FA), were measured in all subjects.

Results: In HAP subjects, the etiology of PAH was unknown in 87%, or HIV (13%). Functional class was I (6.2 %), II (68.3%) or III (25%). Mean PAP was 51.3 ± 1.9 . Compared to healthy subjects, PAH patients had significantly lower RV FA, ACE2 and Ang-(1-9) levels. Also they had greater ACE plasma activity and AngII circulating levels. Significant correlations were found between Ang-(1-9) and mPAP (-0.701 , $p < 0,001$) and between Ang-(1-9) and RV FA ($r = 0.549$, $p < 0,01$).

Conclusion: group I PAH subjects, circulating levels of Ang-(1-9) are significantly lower than in healthy subjects and are inversely related to PAP, severity of ventricular remodeling and right ventricular dysfunction. The use of Ang-(1-9) as a vasodilator and cardioprotector agent could be clinically useful in PAH subjects.

Introducción:

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad incurable, progresiva y debilitante del sistema vascular pulmonar que limita al paciente en su capacidad de actividad física y actividades rutinarias¹. Dado que los principales síntomas de la HAP como fatiga, disnea y edema de extremidades no son específicos, el diagnóstico de la enfermedad normalmente es tardío hasta después que la enfermedad está bien establecida².

Principalmente, la HAP afecta arteriolas pulmonares pequeñas¹ y se caracteriza por disfunción endotelial, mayor contractibilidad arteriolar pulmonar y angioproliferación producto de mayor crecimiento celular y apoptosis en células endoteliales, fibroblastos adventiciales, y células musculares lisas vasculares (CMLV).³ En la HAP, el remodelamiento vascular adverso tiene como consecuencias un aumento en la presión promedio de arteria pulmonar (mPAP) ≥ 25 mm Hg y de la resistencia vascular pulmonar (RVP) > 3.0 unidades Wood.⁴ El aumento persistente de la RVP promueve mayor sobrecarga del ventrículo derecho (VD) y, finalmente, insuficiencia irreversible del VD y muerte.⁵

La HAP una vez establecida no solo afecta al pulmón y el VD, sino que también produce anormalidades en el bazo (activación de células inmunes), médula ósea (disfunción del precursor celular endotelial), y músculo esquelético (resistencia a la insulina).⁶ Por lo tanto, la HAP puede considerarse como un síndrome multiorgánico.⁶ En los pacientes con HAP el remodelamiento del VD se caracteriza por hipertrofia de los cardiomiocitos, rigidez y fibrosis intra-miocrárdica⁷. En etapas tempranas de la HAP, el remodelamiento del VD es una respuesta adaptativa para compensar la sobrecarga del VD⁷. Sin embargo, con el tiempo el VD se hipertrofia, dilata, disminuye su función sistólica y finalmente cursa hacia insuficiencia cardíaca (IC).⁸ De hecho, la insuficiencia cardíaca derecha es la principal causa de muerte de los pacientes con HAP.⁸

La HAP ha mostrado ser una consecuencia de alteraciones en la homeostasis de vasoconstrictores y vasodiladores, inhibidores de crecimiento, factores mitogénicos, antitrombóticos, y protrombóticos.⁹ El tratamiento actual de la HAP potencia la vía del óxido nítrico, de las prostaciclina e inhibe la vía de la endotelina, restringiendo el uso de los bloqueadores del calcio a los pacientes vaso-reactivos. Además, se recomienda el uso de anticoagulación. Recientes estudios clínicos se han enfocado en drogas anti proliferativas.¹⁰ Aún con estos avances la HAP permanece incurable, el manejo de la insuficiencia del VD es subóptima para muchos pacientes, y la mortalidad

por HAP es aún muy alta.¹¹ Por lo tanto, es prioritario entender la patofisiología de la enfermedad e identificar nuevos blancos y agentes terapéuticos para disminuir la mortalidad en la HAP.

La vía clásica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) está activado en la HAP experimental y en pacientes, modulando el remodelamiento función cardiopulmonar.¹² Angiotensina (Ang) II y aldosterona a través de sus receptores tipo 1 de Ang II (RAT1) y de mineralocorticoide (MR), respectivamente, regulan las vías intracelulares que inducen hipertrofia vascular y fibrosis al activar procesos de proliferación y migración e inhibir procesos de reparación.¹³ Por lo tanto, el eje Ang II-AT1R-aldosterona-MR tiene efectos deletéreos en la HAP. El descubrimiento de una vía paralela o no canónica del RAS, compuesta de la enzima convertidora de Ang II homóloga (ECA2), Ang-(1-9), Ang-(1-7) y de su receptor Mas, muestran que el eje ECA/AngII/RAT1 puede ser contra regulado ya que la activación del eje ECA2-Ang-(1-9)-Ang-(1-7)-RMas induce vasodilatación y efectos anti hipertróficos y anti hiperplásicos, sugiriendo el rol protector de la ECA2 y de los péptidos vasoactivos Ang-(1-7) and Ang-(1-9) en la HAP. Previamente, hemos encontrado que en la disfunción ventricular post infarto al miocardio experimental la activación del eje clásico del SRA, ECA/Ang II se correlaciona negativamente con la ECA2 y el péptido vasoactivo y cardioprotector Ang-(1-9).¹⁴ Resultados preclínicos muestran eficacia de la administración de Ang-(1-9) en el tratamiento de la hipertensión¹⁵ y del remodelamiento CV patológico.¹⁵ Hasta la fecha, no existen antecedentes de los niveles circulantes de Ang-(1-9) en pacientes con HAP comparados con sujetos sanos. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles circulantes de Ang-(1-9) en pacientes con HAP y compararlos con sujetos sanos pareados por edad y sexo.

Materiales y métodos:

La presente investigación corresponde a un subestudio dentro de un trabajo orientado a evaluar el efecto de un inhibidor de la oxidación de ácidos grasos en la función y remodelamiento del ventrículo derecho y perfil de micro RNAs en pacientes con hipertensión pulmonar y del que se han conservado plasmas y suero para análisis posteriores. Los estudios se adhirieron a los principios de declaración de Helsinki y fueron revisados por el Comité de ética en Investigación Humana de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todos los sujetos fueron debidamente informados de la investigación y

firmaron un consentimiento informado aprobado antes de ingresar al estudio. Los expedientes médicos de todos los pacientes fueron revisados para evaluar la elegibilidad de ingreso al estudio junto con los detalles adicionales proporcionados por el médico remitente.

1.- Diseño del estudio. Estudio comparativo abierto de pacientes con HAP vs. sujetos controles. 1.1. Criterios de inclusión: a) hombres y mujeres mayores de 18 años con HAP del grupo 1 de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y que fueron referidos para evaluación a nuestro centro de HAP con mPAP ≥ 25 mm Hg evaluada en reposo por cateterismo derecho. Se ingresaron pacientes pertenecientes a uno de los siguientes subgrupos: idiopática, hereditaria, inducida por drogas o toxinas, o asociada con enfermedad del tejido conectivo o infección por VIH. b) diagnóstico hemodinámico de HAP realizado mediante sondeo cardíaco derecho al momento de la inscripción. c) Formulario de consentimiento informado firmado. 1.2. Criterios de exclusión: a) HAP pertenecientes a los grupos 2 a 5 de la clasificación de la OMS o de los subgrupos del grupo 1 no cubiertos en los criterios de inclusión. b) enfermedad pulmonar obstructiva o restrictiva en grado moderado o severo. c) insuficiencia hepática moderada o severa. d) disfunción ventricular izquierda sistólica o diastólica evaluada por ecocardiograma. e) insuficiencia renal (creatinina plasmática >1.5 mg/dl). f) estar recibiendo o hayan recibido alguna droga experimental. g) problemas mentales, adicción a drogas u otros desórdenes que limiten la capacidad de entregar consentimiento informado. Grupo Control: voluntarios sanos, sin enfermedad cardiovascular, cardiopatía estructural ni pulmonar pareados por edad y sexo, con iguales criterios de exclusión.

2.- Parámetros clínicos y de laboratorio: La capacidad de ejercicio por test de caminata de 6 minutos (TC6M) e índice de disnea de Borg se evaluaron de acuerdo a las guías de la Sociedad Torácica Americana.¹⁶ Durante el test de caminata cada participante usó un oxímetro de pulso y se monitoreó su frecuencia cardíaca.

3. Parámetros funcionales: en todos los pacientes se realizó ecocardiografía transtorácica Doppler y se determinaron los siguientes parámetros: mPAP, RVP, excursión en sístole del plano anular tricuspídeo (TAPSE), velocidad de la onda sistólica del anulus lateral tricúspide con Doppler tisular (onda s'), geometría de la aurícula y dimensiones, geometría del VD y dimensiones en sístole y diástole y cambio del área fraccional del VD (FAC).¹⁷

4. Parámetros sanguíneos y bioquímicos: Se determinaron hemograma, hematocrito, glicemia, creatinina plasmática, potasio, ácido úrico, recuento de glóbulos blancos (RGB), nitrógeno ureico (BUN), transaminasa pirúvica (SGPT), transaminasa oxalacética (SGOT), colesterol total, colesterol HDL y LD.

5. Niveles circulantes del péptido natriurético cerebral (proBNP): Se determinaron por métodos estándares del Laboratorio Clínico de la Red de Salud UC-Christus.

6. Actividades plasmáticas de ECA y ECA2: Ambas mediciones se realizaron por método fluorimétrico.¹⁴

7. Niveles circulantes de Ang II y Ang-(1-9): Ambos péptidos se midieron de acuerdo a lo descrito por Ocaranza et al.¹⁴

Tabla I. Datos demográficos, presión arterial y frecuencia cardíaca

Características	Pacientes con HAP (n = 16)	Sujetos controles (n= 14)	p
Edad (Años)	51,4 $\pm$ 3,1	53,0 $\pm$ 2,3	NS
Mujeres (%)	81	79	NS
Peso (Kg)	68,2 $\pm$ 3,6	65,1 $\pm$ 3,79	NS
IMC (Kg/m2)	26,9 $\pm$ 1,0	24,8 $\pm$ 1,1	NS
PAS (mm Hg)	117,1 $\pm$ 3,6	109,7 $\pm$ 3,9	NS
PAD (mm Hg)	73,6 $\pm$ 2,3	71,0 $\pm$ 2,4	NS
FC (latidos por minuto)	72,7 $\pm$ 3,2	64,6 $\pm$ 2,0	NS
Los resultados muestran promedio $\pm$ DE. NS: no significativo

Tabla II. Etiología de la HAP, capacidad funcional y datos de tratamiento de los pacientes con HAP.

Características	Pacientes con HAP (n =16)
Etiología HAP	
Idiopática(%)	86,7
VIH (%)	13,3
Capacidad funcional (según NYHA)	
I (%)	6,2
II	68,8
III (%)	25
IV (%)	0
Tratamiento de los pacientes	
Espironolactona (%)	53
acenocumarol/Warfarina (%)	47
Bosentan/Ambri-sentan (%)	27
Sildenafil (%)	80
Iloprost (%)	7
Digoxina (%)	13

Análisis estadístico: Diferencias entre pacientes con HAP y sujetos controles se determinaron por prueba de t de Student. Correlaciones entre respuesta hemodinámica, cambio de área fraccional y niveles de los péptidos Ang II

y (1-9) se determinaron por método de Spearman con el programa estadístico SPSS 10.0. Variables categóricas se expresaron como porcentaje y variables continuas como promedio $\pm$ desviación estándar. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados:

Características clínicas

El estudio estuvo compuesto por 16 pacientes con mPAP > 25 mmHg ingresados consecutivamente (edad promedio $51,4 \pm 3,1$ años, 81 % mujeres); y fueron pareados por edad y sexo con 14 sujetos asintomáticos sanos sin enfermedad cardiovascular, cardiopatía estructural ni diabetes (edad promedio $53,0 \pm 2,3$ años, 79% mujeres), con electrocardiograma, ecocardiograma normales. Los parámetros demográficos, índice de masa corporal (IMC), presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) fueron similares entre los pacientes con HAP y sujetos controles (Tabla I).

La etiología de la HAP fue idiopática (86,7%) y por VIH (13,3%). Los pacientes estaban en capacidad funcional (según NYHA): I (6,2%), II (68,8%) y III (25%) y recibiendo tratamiento farmacológico con espironolactona (53%), acenocumarol/warfarina (47%), bosentan/ambri-sentan (27%), sildenafil (80%), iloprost (7%) y digoxina (13%) (Tabla II).

Tabla III. Pruebas clínicas y de laboratorio

Pruebas	Pacientes con HAP (n = 16)	Sujetos controles (n = 14)	p
TC6M (mts)	431 $\pm$ 26		
Índice de Borg	4,0 $\pm$ 0,8		
Hematocrito (%)	41,0 $\pm$ 1,3	42,7 $\pm$ 1,3	NS
Hemoglobina (g/dL)	13,6 $\pm$ 0,4	14,3 $\pm$ 0,5	NS
RGB (103/mm ³)	4,6 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,5	$< 0,01$
Plaquetas (103/mm ³)	252,2 $\pm$ 12,9	239,9 $\pm$ 16,9	NS
Glicemia (mg/dL)	87,7 $\pm$ 1,6	48,4 $\pm$ 4,1	NS
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,7 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	NS
BUN (mg/dL)	12,6 $\pm$ 1,1	14,8 $\pm$ 1,4	NS
Na ⁺ (mEq/L)	141,5 $\pm$ 0,5	140,1 $\pm$ 0,6	NS
K (mEq/L)	4,1 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,1	NS
SGOT (mg/dL)	19,8 $\pm$ 1,9	23,6 $\pm$ 1,6	NS
Acido úrico (mg/dL)	4,4 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,4	NS
Colesterol sérico (mg/dL)	203,0 $\pm$ 6,8	190,4 $\pm$ 12,7	NS
Colesterol LDL (mg/dL)	126,2 $\pm$ 6,7	115,0 $\pm$ 11,4	NS
Colesterol HDL (mg/dL)	58,0 $\pm$ 5,3	51,8 $\pm$ 6,4	NS
Triglicéridos (mg/dL)	110,1 $\pm$ 23,2	111,9 $\pm$ 21,3	NS

Los valores representan el promedio $\pm$ DE. NS indica no significativo; T6CM: prueba caminata 6 minutos; RGB: recuento de glóbulos blancos; BUN: nitrógeno ureico en la sangre; SGOT: transaminasa glutámico oxalacética sérica. Valores P fueron determinados por prueba T.

Tabla IV. Datos hemodinámicos y ecocardiográficos			
Parámetros	Pacientes (n=16)	Controles (n=14)	p
sPAP (mmHg)	90,2 ± 4,6		
RVP (unidades Wood)	12,5 ± 1,3		
PCP (mmHg)	12,3 ± 1,5		
Gasto cardiaco (L/min)	3,8 ± 0,4		
TAPSE (mm)	16,7 ± 1,5		
Velocidad onda S' (cms/seg)	8,9 ± 0,8		
Area aurícula derecha (cm2)	27,8 ± 2,7		
Volumen aurícula derecho (mL)	101,5 ± 14,3		
Area VD en diástole (cm2)	26,4 ± 2,0		
Area VD en sístole (cm2)	18,8 ± 1,5		
Volumen VD en diástole, 4C (mL)	83,9 ± 9,5		
Volumen VD en sístole, 4C (mL)	49,9 ± 6,2		
mPAP (mmHg)	51,3 ± 1,9	24,0 ± 0,3	< 0,001
FAC VD (%)	28,3 ± 1,5	41,5 ± 1,4	< 0,001

Los valores representan el promedio ± DE. sPAP: presión sistólica de arteria pulmonar; RVP; resistencia vascular pulmonar; PCP: presión capilar pulmonar; FAC: cambio de área fraccional del VD. Valores P fueron determinados por prueba T.

Los análisis de sangre y orina de pacientes y sujetos controles fueron similares entre ambos grupos, exceptuando por el recuento de glóbulos blancos (RGB), (Tabla III). La mPAP fue significativamente mayor en los pacientes con HAP (presión promedio 51,3 ± 1,3) versus los sujetos controles (presión promedio 24,0 ± 0,3). El índice de evaluación de la función ventricular derecha, FAC mostró estar significativamente disminuido en los pacientes

con HAP (Tabla IV).

Activación de la vía clásica del RAS. Aunque los pacientes con HAP estaban recibiendo tratamiento farmacológico y todos ellos estaban clínicamente estables al momento de la evaluación, la actividad circulante de la ECA y los niveles plasmáticos de Ang II fueron significativamente mayores en los pacientes comparados con los controles sanos pareados por edad y sexo en un 67,4% y

Figura 1. Actividad plasmática de ECA y ECA2 en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (grupo 1, OMS). Las actividades plasmáticas de ECA y ECA2 se determinaron por fluorimetría. Se compararon las actividades de pacientes (n=16) con controles, sujetos sanos pareados por edad y sexo (n=14). *p< 0.05 vs sujetos controles.

Figura 2. Niveles circulantes de Ang II y Ang-(1-9) en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (grupo 1, OMS). Los niveles circulantes de Ang II y Ang-(1-9) se determinaron de acuerdo a lo descrito por Ocaranza et al¹⁴. Se compararon los niveles de las Angs de pacientes (n=16) y controles, sujetos sanos pareados por edad y sexo (n=14). *p< 0.05 vs sujetos controles.

Figura 3. Relación entre la presión de arteria pulmonar media y los niveles circulantes de Ang-(1-9). La correlación entre la presión de arteria pulmonar media y los niveles circulantes de Ang-(1-9) de los controles y pacientes con HAP se determinó por método de Spearman con el programa estadístico SPSS 10.0. ● : Pacientes con HAP, ■ : sujetos controles

107%, respectivamente (Figura 1A y 2A).

Inactivación de la vía paralela del RAS y disminución del péptido Ang-(1-9): A diferencia de lo observado en los componentes de la vía clásica del RAS, en la vía paralela del RAS, la actividad de la ECA2 mostró estar significativamente disminuida en los pacientes con HAP (37,6%, Figura 1B) respecto a los sujetos sanos. Igualmente, los niveles circulantes del péptido Ang-(1-9) mostraron estar significativamente disminuidos $114,0 \pm 13,5$ pg/mL vs los niveles circulantes de Ang-(1-9) de los sujetos controles $348,8 \pm 16,5$ pg/mL (Figura 2B).

Figura 4. Relación entre el cambio de área fraccional del VD y los niveles circulantes de Ang-(1-9). La correlación entre el cambio de área fraccional del VD (FAC, %) y los niveles circulantes de Ang-(1-9) de los controles y pacientes con HAP se determinó por método de Spearman con el programa estadístico SPSS 10.0. ● : Pacientes con HAP, ■ : sujetos controles

Relación entre mPAP y niveles circulantes de Ang-(1-9): Estas relaciones se evaluaron correlacionando los niveles circulantes de Ang- (1-9) y la mPAP en cada uno de los pacientes y sujetos controles. Se observó un nivel de correlación inversa y significativa entre la mPAP y los niveles circulantes de Ang-(1-9) ($\rho = -0.701$, $p < 0,001$) (Figura 3).

Relación entre cambio del área fraccional del VD y niveles circulantes de Ang-(1-9): El análisis de la relación entre el cambio del área fraccional del VD (FAC), índice de evaluación de la función ventricular derecha y niveles

Figura 5.
Relación entre el test de caminata de 6 minutos y los niveles circulantes de Ang-(1-9) en los pacientes con HAP. La correlación entre el test de caminata de 6 minutos y los niveles circulantes de Ang-(1-9) en los pacientes con HAP se determinó por método de Spearman con el programa estadístico SPSS 10.0.

plasmáticos de Ang-(1-9) mostró correlación directa y significativa ($\rho = 0,549$, $p < 0,01$, (Figura 4).

Relación entre test de caminata de 6 minutos y niveles circulantes de Ang-(1-9): El análisis de la relación entre el test de caminata de 6 minutos y niveles circulantes de Ang-(1-9) mostró correlación directa y significativa ($\rho = 0,852$, $p < 0,001$, Figura 5).

Discusión:

En este estudio, encontramos que pacientes con HAP del grupo I en la clasificación de la OMS en comparación con sujetos sanos pareados por edad y sexo, presentan: a) Activación de la vía clásica del SRA, con mayor actividad plasmática de ECA y mayores niveles circulantes de Ang II. b) Inactivación de la vía paralela del SRA, con menor actividad plasmática de ECA2 y menores niveles circulantes de Ang-(1-9). c) Correlación inversa y significativa entre la mPAP y los niveles circulantes de Ang-(1-9). d) Correlación directa y significativa entre el cambio de área fraccional del VD y el TC6M con los niveles circulantes de Ang-(1-9).

La vía clásica del SRAA está activada en la HAP humana y experimental. Al respecto, Ang II y aldosterona regulan las vías intracelulares que gatillan el desarrollo de hipertrofia y fibrosis por aumento de la proliferación y migración celular e inhibiendo el proceso de reparación tisular.^{13,18}

La etiología de la HAP se ha ligado a polimorfismos en los genes que codifican para componentes del SRAA tales como angiotensinógeno (AGT)¹⁹, ECA¹⁹, y RA-T1R.²⁰ En el pulmón, la producción de Ang II depende de la ECA. Por lo tanto, esta enzima tiene un rol importante en el origen de la HAP. Es conocido que la Ang II estimula el crecimiento de células musculares lisas vasculares (CMLV) y el remodelamiento de la vasculatura pulmonar.²¹ Ang II ejerce acciones mitogénicas en CMLV e induce migración, hipertrofia y proliferación.²² Además, Ang II estimula procesos inflamatorios y produce especies reactivas al oxígeno (ROS), factores que contribuyen a la HAP.²³

Nuestros resultados muestran que pacientes con HAP (grupo 1, OMS), bajo tratamiento y caracterizados por un valor promedio de mPAP de $51,3 \pm 1,3$ mmHg, valor promedio de RVP $12,5 \pm 1,3$ unidades Wood, remodelamiento y disfunción ventricular derecha, presentan mayor actividad plasmática de la ECA y niveles circulantes de Ang II respecto a sujetos sanos, sin enfermedad cardiovascular, cardiopatía estructural ni pulmonar pareados por edad y sexo, con iguales criterios de exclusión. Al respecto, recientemente, De Man y cols.¹³ demostraron que la actividad de renina y ECA como también los niveles circulantes de Ang I y Ang II son significativamente mayores en pacientes con HAP idiopática (iHAP) versus sujetos sanos. Además, mayores niveles circulantes de Ang II y actividad de renina se asociaron con mayor riesgo de muerte o trasplante de pulmón, aún después de corregir por edad, sexo, y tiempo de diagnóstico de la enfermedad.¹³ Junto con esto, ensayos *in vitro* mostraron que mayor actividad de la ECA en las células endoteliales de pacientes con HAP producen más Ang II, la cual es capaz de estimular la proliferación de CMLV vía el RAT1.¹³ En este mismo estudio el análisis de un subgrupo de 21 pacientes con seguimiento clínico y mediciones seriadas de componentes de SRAA mostraron que mayor actividad renina y niveles circulantes de Ang I y Ang II se asociaron con empeoramiento de la iHAP.¹³ En este mismo estudio al dividir los pacientes en 2 grupos, pacientes con iHAP estables (disminución TC6M $<10\%$) e iHAP progresiva (disminución TC6M $>10\%$)¹³ se encontró que la actividad renina y los niveles circulantes de Ang I y Ang II se mantienen estables en pacientes con iHAP estable. Sin embargo, la actividad de renina y niveles circulantes de Ang I y II aumentan significativamente en pacientes con HAP progresiva.¹³

La vía paralela del RAAS está compuesta por la ECA2, Ang-(1-9), Ang-(1-7) y el receptor Mas de Ang-(1-7). La

activación de esta vía induce vasodilatación, anti-hipertrofia y anti-hiperplasia, sugiriendo un posible rol protector para la ECA2 y los péptidos vasoactivos Ang-(1-7) y Ang-(1-9) en la HAP.

Nuestro grupo fue el primero en identificar el rol de Ang-(1-9) en la contra regulación del eje ECA/Ang II del SRAA clásico.¹⁴ Específicamente, en el modelo experimental de ratas infartadas con disfunción ventricular izquierda se encontró que la actividad circulante y en ventrículo izquierdo (VI) de la ECA2 está significativamente disminuida, efecto que fue prevenido por el inhibidor convencional de la ECA, enalapril.¹⁴ Junto con esto, los niveles circulantes de Ang(1-9) aumentaron significativamente en las ratas infartadas y controles tratadas con enalapril. Sin embargo, los niveles circulantes del péptido vasodilatador, anti hipertrófico, y antifibrótico Ang-(1-7) no se modificaron.¹⁴ Basados en estos antecedentes, propusimos por primera vez que Ang-(1-9) más que Ang-(1-7) contrarregula Ang II en este modelo experimental de insuficiencia cardíaca.¹⁴

Nuestros resultados muestran que pacientes con HAP (grupo 1, OMS), bajo tratamiento y caracterizados por un valor promedio de mPAP de $51,3 \pm 1,3$ mmHg, valor promedio de RVP $12,5 \pm 1,3$ unidades Wood, con remodelamiento y disfunción ventricular derecha presentan significativamente menor actividad circulante de ECA2, la cual correlaciona de manera inversa con la mPAP ($\rho=0,701$, $p<0,001$). Resultados similares han mostrado que los niveles proteicos de la ECA2 son significativamente menores en pacientes con cardiomiopatía dilatada hipertrofica con HAP respecto a pacientes con cardiomiopatía dilatada hipertrofica sin HAP.²⁴

Recientemente, la efectividad de los agonistas de ECA2 en el tratamiento de la HAP ha sido evaluada a nivel preclínico. Al respecto, en ratas con HAP inducida por la administración de monocrotalina (MCT), la terapia por sobreexpresión de la ECA2 previno el aumento de la presión sistólica del VD y la hipertrofia del VD. Además, la sobreexpresión de la ECA2 mejoró la función del VD en modelos de coartación de la arteria pulmonar.²⁵ Moléculas sintéticas que aumentan la actividad de ECA2 producen similares resultados.²⁶ Aunque ahora es generalmente aceptado que la ECA2 cumple un rol en la patogenia de la HAP, remodelamiento vascular y del VD, el mecanismo a través del cual la ECA2 protege al sistema cardiovascular y pulmonar es desconocido. Posibles mecanismos incluyen mayor degradación de Ang II y mayor formación de los péptidos Ang-(1-7) o Ang-(1-9). Además, la función biológica de la ECA2 la cual forma Ang-

(1-9), refuerza la idea que este péptido es un componente del sistema vasodilatador del SRAA y también modula la HAP y reduce el remodelamiento del VD y vascular.

Nuestros resultados muestran por primera vez que pacientes con HAP (grupo 1, OMS), bajo tratamiento, estables y caracterizados por un valor promedio de mPAP de $51,3 \pm 1,3$ mmHg, valor promedio de RVP $12,5 \pm 1,3$ unidades Wood, remodelamiento y disfunción ventricular derecha presentan significativamente menores niveles circulantes de Ang-(1-9), respecto a sujetos sanos sin enfermedad cardiovascular pareados por edad y sexo. En estos pacientes con HAP los niveles circulantes de Ang-(1-9) correlacionaron significativamente y de manera inversa con la mPAP ($\rho=-0,701$, $p<0,001$). Además los niveles circulantes de Ang-(1-9) correlacionaron de manera directa con el índice FAC, marcador de la función ventricular derecha ($\rho=0,549$, $p<0,01$) y con el TC6M ($\rho=0,852$, $p<0,001$). Por lo tanto, Ang-(1-9) emerge como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la HAP y del remodelamiento vascular y del VD.

Nuestros estudios preclínicos han mostrado la eficacia de Ang-(1-9) en el tratamiento de la hipertrofia cardíaca in vivo and in vitro.²⁷ Al respecto, la administración crónica de Ang-(1-9) a ratas infartadas disminuyó los niveles circulantes de Ang II, inhibió la actividad circulante y en ventrículo izquierdo de ECA y previno la hipertrofia de los cardiomiocitos.²⁷ Además, en 2 modelos experimentales de hipertensión (infusión de Ang II y modelo Goldblatt, 2 riñones -1 clip), la administración crónica de Ang-(1-9) disminuyó significativamente el daño cardiovascular hipertensivo al disminuir la hipertrofia, fibrosis, y estrés oxidativo.¹⁵ Estos efectos de Ang-(1-9) fueron mediados por el receptor tipo 2 de Ang II (RAT2).^{15,28} Resultados de otros investigadores han mostrado que el tratamiento con Ang-(1-9) mejora la cardiomiopatía y atenúa la disfunción miocárdica inducida por estreptozotocina.²⁹

Igualmente, Ang-(1-9) muestra eficacia en el tratamiento de la hipertensión arterial, efecto que es mediado por su unión al RAT2.¹⁵ El mecanismo propuesto que pudiera explicar este efecto es que Ang-(1-9) al unirse a su receptor RAT2 liberaría vasodilatadores endoteliales.¹⁵ Nuestros estudios funcionales en arterias de resistencia ex vivo mostraron que Ang-(1-9) mantiene la relajación dependiente del endotelio e inducida por acetilcolina en aortas de ratas tratadas con Ang II.¹⁵ Ang-(1-9) también aumentó los niveles de mRNA aórticos de eNOS, efecto que se asoció a mayores niveles plasmáticos de nitratos. Todos estos efectos de Ang-(1-9) fueron bloqueados por PD123319 (bloqueador del RAT2), indicando que

Ang(1-9) aumenta la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) a través de un mecanismo mediado por RAT2.¹⁵ Igualmente, la administración de Ang-(1-9) mejoró la vaso relajación y los niveles de ON en ratas "stroke-prone" espontáneamente hipertensas.³⁰ Flores-Muñoz y cols mostraron que Ang-(1-9) aumentó la expresión de la NADPH oxidasa 4,³⁰ la cual previamente se asoció con vasodilatación dependiente del endotelio y mediada por ON.³⁰ Adicionalmente, Ang-(1-9) también estimuló la secreción del péptido natriurético vía el mecanismo de señalización AT2R/PI3K/Akt/NO/cGMP.³¹ En conjunto con ON, Ang-(1-9) también induce la liberación de ácido araquidónico – otro vasodilatador que pudiera estar implicado en el mecanismo de acción de Ang-(1-9).³² Por lo tanto, Ang-(1-9) a través de su RAT2 podría disminuir el remodelamiento vascular adverso en la HAP.

En conclusión, toda la información presentada aquí sugiere muy fuertemente que el péptido cardioprotector Ang-(1-9) es relevante y potencialmente útil desde una perspectiva clínica en la HAP. La administración de Ang-(1-9) podría disminuir la presión de arteria pulmonar y mejorar el remodelamiento vascular y del VD en la HAP. Por lo tanto, este péptido podría ser un blanco farmacológico para el tratamiento de la HAP.

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por Fondef D11I1122 (MPO, JJ), Fondecyt 1141198 (PC, HV, LG), Fondep 15130011 (MPO, PC, HV, LG), Grant Puente-Pontificia Universidad Católica de Chile P1705/2017 (MPO) y Bayer AG, Program Grants4Targets ID 2017-08-2260 (MPO, JJ).

Referencias

1. LAI Y, POTOKA K, CHAMPION H, MORA A, GLADWIN M. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res*. 2014; 115:115-130.
2. MAIR K, JOHANSEN A, WRIGHT A, WALLACE E, MACLEAN M. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. *Br J Pharmacol*. 2014; 171:567-579.
3. RABINOVITCH M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2008;118:2372-2379.
4. PRINS K, THENAPPAN T. World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension: Epidemiology and Pathophysiology. *Cardiol Clin*. 2016; 34:363-374.
5. GALIÈ N, HOEPER M, HUMBERT M, TORBICKI A, VACHIERY J, BARBERA JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2009;30:2493-2537.
6. MCLAUGHLIN V, ARCHER S, BADESCH D, BARST R, FARBER H, LINDNER J, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53:1573-1619.
7. BRONICKI R, BADEN H. Pathophysiology of right ventricular failure in pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11:S15-S22.
8. BOGAARD H, ABE K, VONK NOORDEGRAAF A, VOELKEL N. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135:794-804.
9. FARBER H, LOSCALZO J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004; 351:1655-65.
10. BRADFORD C, ELY D, RAIZADA M. Targeting the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system: a novel strategic approach to pulmonary hypertensive therapy. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12:212-219.