

Universidad del Bío-Bío

Facultad de Ciencias

Departamento de Ciencias Básicas



Identificación de nuevas variables cardiopulmonares en el desarrollo
de Hipertensión Pulmonar Neonatal ovina mediante *Machine Learning*

Honoraria Catalina Muñoz Vásquez

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas

Profesor Tutor: Dr. Andrés Rodríguez Morales

Profesor Co-tutor: Dr. Germán Ebensperger Darrouy

CHILLÁN 2021

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	4
Introducción	6
Hipertensión Pulmonar.....	6
Clasificación de la Hipertensión Pulmonar	7
Fisiología Pulmonar en el Recién Nacido	7
Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido ...	10
Mecanismo Moleculares involucrados en Hipertensión Pulmonar neonatal	11
Tratamiento	13
Diagnóstico	15
Modelo de estudio, neonato ovino	16
Machine Learning.....	19
Evidencia que sustenta la hipótesis	24
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y Métodos	26
Comité de Bioética	26
Animales	26
Mediciones Fisiológicas <i>in vivo</i> , preparación experimental y procedimientos quirúrgicos.....	27
Protocolo Experimental <i>In vivo</i>	28
Análisis y correlación de datos por estadística monovariada	30
<i>Machine Learning</i>	31
Análisis de datos mediante <i>Machine Learning</i> : Aprendizaje No Supervisado....	31
Análisis de datos mediante <i>Machine Learning</i> : Aprendizaje Supervisado	36
Resultados	40
Análisis de variables cardiopulmonares	40
Análisis entre ovinos gestados en tierras bajas y tierras altas	40
Análisis entre condiciones de estímulo basal e hipoxia sobre-agregada	41
Análisis de Agrupamiento Jerárquico.....	43

Análisis de individuos por altitud	43
Análisis de individuos considerando cada estímulo por separado	44
Análisis de agrupación de variables según altitud	45
Distribución de grupos mediante Análisis de Componentes Principales	47
Principales Variables clínicas que permiten clasificar la Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido	52
Mapa de calor de <i>loadings</i> de variables cardiopulmonares en cada Componente Principal	54
Mínimos Cuadrados Parciales	56
Discusión y Conclusión	61
Referencias Bibliográficas	77

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, pareja y amigos que me han brindado su apoyo incondicional durante

la realización del programa de Magister.

A mi profesor Tutor Andrés Rodríguez, por la orientación, contención y

colaboración constante, durante la realización de la tesis.

A mi profesor Co-Tutor Germán Ebensperger, por la paciencia, dedicación y

entrega de nuevos conocimientos durante este proceso.

A los miembros del Laboratorio de Dinámica y Comunicación Celular

A mis compañeros y docentes del Magister en Ciencias Biológicas

RESUMEN

Introducción: La Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido (HPPN) es un trastorno caracterizado por la falla en la caída de la Resistencia Vasculat Pulmonar, producto de un desequilibrio de vasodilatadores y vasoconstrictores debido a la disminución de oxígeno. La prevalencia es de 1,9 a 7,0 por 1000 nacidos vivos. La mortalidad esta entre un 4% a 33% de acuerdo con su etiología, y la sobrevida oscila entre un 35 a un 40%, sin embargo, algunas de las secuelas son daño neurológico, problemas cardiopulmonares y dificultades en su crecimiento. El diagnóstico de HPPN se basa en criterios hemodinámicos siendo determinada por tres variables: Presión Arterial Pulmonar (PAP), Gasto Cardiaco (GC) y pO_2 , es así que ignora otras variables cardiopulmonares que pueden influir en el desarrollo de la HPPN, es por esto que el presente modelo se basa en incluir otras variables de cardiopulmonares al momento del diagnóstico, utilizando, para esto, las herramientas de análisis *Machine Learning*. **Objetivo:** Identificar la incidencia de variables morfofisiológicas no consideradas en la evaluación diagnóstica de hipertensión pulmonar neonatal en modelo ovino mediante *Machine Learning*. **Metodología:** se utilizarán las herramientas de aprendizaje supervisado (PLS) y no supervisado (HCA y PCA), lo que permite determinar las variables cardiopulmonares que tienen mayor influencia en la HPPN. El grupo de estudio son 27 ovinos recién nacidos en diferentes altitudes y distintas condiciones de oxigenación. **Resultados:** al analizar las diferentes variables cardiopulmonares por medio de la utilización de la metodología PLS se obtiene que pH, pCO_2 , %Sat, Cont O_2 y Hb, son variables de peso y significativas a la hora de diagnosticar la

HPPN. **Conclusión:** para el diagnóstico de HPPN se debe considerar una mayor cantidad de variables cardiopulmonares, tales como, pH, pCO₂, %Sat, Cont O₂ y Hb, ya que esto permite optimizar el diagnóstico, lo que a su vez se ve propiciado por la aplicación del método presentado, ya que este otorga más opciones de obtener PAP, y con ello prescindir de la utilización del cateterismo derecho (método clásico).

Palabras Claves: Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién (HPPN), Análisis de Componente Principales (PCA), Análisis de Agrupamiento jerárquico (HCA), Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

INTRODUCCIÓN

1. Hipertensión Pulmonar

La hipertensión pulmonar (HAP) se define como un trastorno crónico de la vasculatura pulmonar, caracterizado por un aumento progresivo de la resistencia vascular pulmonar que conduce a insuficiencia cardíaca derecha y finalmente la muerte. La HAP puede ser idiopática o estar asociada con enfermedades subyacentes. La patogenia de la HAP incluye una combinación de vasoconstricción, inflamación, remodelación estructural de los vasos pulmonares (endotelio y músculo liso) y trombosis *in situ* que implica la disfunción de las vías celulares subyacentes¹

En el último Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar (HAP) celebrado en Niza en 2018, este síndrome recientemente actualizó su definición, relacionándose con el cambio en la definición hemodinámica de la HAP, donde se concluye que una presión pulmonar arterial media (PAPm) ≥ 20 (mmHg) estaría por encima del límite superior de la normalidad. No obstante, los expertos opinan que este punto de corte de 20 (mmHg), por sí solo, no sería suficiente para definir la enfermedad vascular, ya que puede estar elevado por otras causas, como un incremento del gasto cardíaco, o un aumento de la presión de enclavamiento pulmonar, por lo que deciden incluir una resistencia vascular pulmonar (RVP) ≥ 3 Unidades Wood (UW) en la definición de todas las formas de HAP precapilar²

2. Clasificación de la Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)

La hipertensión pulmonar de acuerdo con su etiología se clasifica en cinco grupos. El **grupo 1** se caracteriza porque la HAP puede ser producida por alteraciones en la función de la circulación pulmonar como tal, por ejemplo, idiopática (HAPI) hereditaria / familiar o asociada con otras afecciones médicas como la enfermedad del tejido conectivo, infección por VIH, hipertensión portal, drepanocitosis enfermedad y cardiopatía congénita. La HAP también se ha asociado con la exposición a fármacos y toxinas, también es causada por una enfermedad veno-oclusiva pulmonar o está relacionada con la hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido, el **grupo 2**, incluyen enfermedades del corazón izquierdo, **grupo 3**, enfermedades pulmonares crónicas e hipoxia, **grupo 4**, HP tromboembólica crónica y **grupo 5** HP relacionada con otros mecanismos poco claros / multifactoriales, por ejemplo, linfangioleiomiomatosis, histiocitosis y sarcoidosis³.

El presente estudio describirá la hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido, clasificada en el grupo 1, señalado anteriormente, por medio del análisis de datos de neonatos ovinos utilizando herramientas de Inteligencia artificial como algoritmos de *Machine Learning*.

3. Fisiología pulmonar en el recién nacido

A través del desarrollo del pulmón fetal ocurren cambios estructurales y funcionales que finalmente van a preparar el pulmón hacia la transición a la respiración aérea. El desarrollo de la vasculatura pulmonar está genéticamente controlado⁴. Antes del

nacimiento, los pulmones están llenos de líquido y la resistencia de la arteria pulmonar (RVP) es muy alta, por lo que solo el 10% del gasto cardiaco combinado fetal pasa por el territorio pulmonar, y esto explica la baja tensión de oxígeno en los alvéolos⁴. En esta etapa del desarrollo del individuo, el órgano que se encarga del intercambio gases es la placenta y no los pulmones.

Un papel importante en el mantenimiento de una RVP fetal alta⁵, son los factores mecánicos como, por ejemplo, los pulmones llenos de líquido, que en conjunto con la forma y tamaño de las células endoteliales fetales logran aumentar la RVP fetal. Además, factores o procesos vasoreguladores, tales como vasoconstrictores circulantes como la endotelina 1 (ET-1), un contenido relativamente bajo en sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO), la prostaglandina (PGI₂)^{6,7} y algunos productos de la vía de las prostaglandinas, es decir, leucotrienos y tromboxanos, juegan en conjunto con exacerbados procesos como la vasoconstricción pulmonar hipóxica. Estas causas producen presión elevada pero la presión pulmonar elevada es un estado fisiológico normal en el feto.

La transición desde la vida fetal hasta los primeros días de vida neonatal, se caracterizan por una serie de cambios fisiológicos significativos en las funciones hemodinámicas que inician en el momento mismo del trabajo de parto. Posteriormente, continúan con la ventilación pulmonar, el colapso luminal del cordón umbilical, a medida que va aumentando la PO₂ en los alvéolos y en la sangre pulmonar⁸. En paralelo, otro proceso importante es el establecimiento de la capacidad residual funcional (CRF). Eliminar y absorber líquidos pulmonares es un aspecto clave, al momento de disminuir la RVP durante la transición, pues permite evitar el colapso alveolar. La circulación pulmonar se transforma rápidamente,

desde un sistema en la vida fetal de bajo flujo y alta resistencia, a uno, durante el periodo postnatal, de alto flujo y baja resistencia, produciéndose el cierre funcional de las comunicaciones anatómicas como el *ductus arteriosus* (DA) y el foramen oval. Estos procesos, comenzando desde el incremento de la PO_2 , generan aumentos en la expresión y la actividad de mecanismos de señalización de un número de moléculas vasodilatadoras como la prostaciclina (PGI₂) y óxido nítrico (NO), y a la vez, se produce una disminución los de mecanismos vasoconstrictores como endotelina-1 (ET-1) y el factor activador de plaquetas⁹¹⁰.

Paralelamente, se produce un considerable remodelamiento fisiológico de la estructura de las arterias pulmonares, cuyo atributo principal consiste en el adelgazamiento de la pared arterial pulmonar, producido por una disminución en el número de células de músculo liso arterial pulmonar, y un aplanamiento de las células endoteliales pulmonares, entre otros mecanismos ¹¹. El tono vascular pulmonar basal es regulado por un delicado equilibrio entre agentes vasoconstrictores (ET-1, Serotonina y tromboxano) y agentes vasodilatadores (óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), guanosin monofosfato cíclico (cGMP), prostaglandina (PGI₂)¹²

La circulación pulmonar sufre importantes y significativos cambios estructurales y funcionales durante el período perinatal, estos permiten la transición repentina del intercambio de gases placentario al pulmonar¹². Al nacer, normalmente hay un aumento significativo de la PaO_2 cuando el recién nacido comienza a respirar. El rápido aumento de la PO_2 en los alvéolos aumenta síntesis de NO, disminuyendo la expresión del receptor de endotelina tipo A (ETA) y eliminando el estímulo para la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), lo que en conjunto reducen la RVP. A

raíz de esto, aumenta en la PO₂ arterial sistémica, también facilitan el cierre de la DA, acrecentando el gasto cardíaco que pasa por los pulmones y el flujo sanguíneo pulmonar.

4. Fisiopatología de la Hipertensión Pulmonar Persistente el Recién Nacido (HPPN)

La hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido (HPPN) es un síndrome clínico que se caracteriza por una insuficiencia de la circulación pulmonar no permitiendo la caída adecuada de la resistencia vascular pulmonar (PVR) al nacer⁶. Las causas de la HPPN son variadas, y multifactoriales, ya que pueden ser secundaria a enfermedades del parénquima pulmonar, como el síndrome de aspiración de meconio (con o sin asfixia), el síndrome de dificultad respiratoria (SDR), la neumonía o la sepsis (mala adaptación de la vasculatura pulmonar); vasculatura pulmonar remodelada (mal desarrollo) con parénquima pulmonar normal (primario o idiopático); obstrucción intrínseca (policitemia con hiperviscosidad)⁴ o hipoxia crónica durante la gestación, siendo esta última, la causalidad en la que se enfocará y se otorgará en abordaje pertinente en la presente investigación.

La exposición perinatal a hipoxia crónica hace que el proceso de la transición perinatal cardiopulmonar menos eficiente o interfiere en el normal desarrollo de los cambios estructurales y funcionales que ocurren a nivel de mar en los lechos vasculares pulmonares y sistémicos¹³, manifestándose el síndrome de hipertensión pulmonar persistente del neonato¹⁴. Cabe señalar que la hipertensión pulmonar

persistente del recién nacido (HPPN) es una causa frecuente de insuficiencia respiratoria hipoxémica, tanto en recién nacido a término, como en neonatos prematuros¹⁵. La prevalencia es de 1,9 a 7,0 por 1000 nacidos vivos^{14,16}

Cuando de manifiesta el cuadro de HPPN, la RVP es elevada, debido a la vasoconstricción que se produce en respuesta a la baja tensión de oxígeno¹⁹. Esta elevada RVP, se puede normalizar mediante la regulación del óxido nítrico, la endotelina o la prostaciclina, además es importante destacar que pH juega un rol importante ya que puede modular los efectos del oxígeno sobre la PVR ya que la acidemia aumenta la RVP y acentúa las respuestas vasoconstrictoras hipóxicas¹⁹¹⁰. La hipoxia perinatal altera estos procesos, donde la PVR que disminuye al nacer se mantiene alta, conservando alta la arteria pulmonar presión arterial (PAP) y DA permeable¹⁴

5. Mecanismos moleculares involucrados en la hipertensión pulmonar neonatal

Al constatar los lineamientos de las terapias actuales o emergentes en la hipertensión pulmonar (HAP) se evidencian tres vías principales implicadas en la reactividad vascular y proliferación anormales de las células del músculo liso de la arteria pulmonar en pacientes con HAP. Estas vías corresponden a los objetivos terapéuticos relevantes de esta patología y se aprecian como un factor importante para la determinación de cuál de las cuatro clases de fármacos (antagonistas del receptor de endotelina, óxido nítrico, inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 y derivados de prostaciclina) corresponderá administrar¹⁷

Prostaciclina y tromboxano A₂, aparecen como los principales metabolitos del ácido araquidónico en las células endoteliales. La prostaciclina es un potente vasodilatador, que además inhibe la agregación plaquetaria y tiene propiedades anti-proliferativas; por su parte, el tromboxano A₂ es un potente vasoconstrictor¹⁸. En la hipertensión pulmonar, el equilibrio entre estas dos moléculas se desplaza hacia el tromboxano A₂¹⁹. Además, al estudiar la expresión de la prostaciclina sintetasa, la enzima que se encarga de la síntesis de prostaciclina, está aumentada en las de las arterias pulmonares pequeñas y medianas de los pacientes con hipertensión pulmonar, especialmente en los pacientes con la de tipo idiopática (HAPI).²⁰

Óxido nítrico (NO), es un potente vasodilatador, configurándose como un inhibidor de la activación de las plaquetas y un inhibidor de la proliferación de las células musculares lisas vasculares; es sintetizado por la familia de enzimas de la NO sintasa. Se han evidenciado niveles reducidos de la isoforma endotelial de la NO sintasa en un modelo animal adulto con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, así como en el tejido vascular pulmonar de pacientes con hipertensión pulmonar, especialmente en la HAPI (Hipertensión Pulmonar idiopática)²⁰. Los efectos del NO están mediados por su segundo mensajero, el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que se degrada rápidamente por la fosfodiesterasa (PDE). El NO en la circulación pulmonar es degradado por las isoenzimas PDE-5, que están presentes en abundancia en el tejido pulmonar. Esta es la base del uso de la inhibición de PDE-5 en HAP²¹.

Endotelina-1 (ET-1), es un potente vasoconstrictor y tiene actividad mitógena para las células musculares lisas de la arteria pulmonar²². En modelos de ratas de

hipertensión pulmonar se han observado niveles elevados de ET-1 se han encontrado en modelos de rata de hipertensión pulmonar²³, así como en el plasma y la pared vascular pulmonar de pacientes con HAPI y otras formas de hipertensión pulmonar. Este aumento de los niveles de ET-1 es proporcional a la magnitud del flujo sanguíneo pulmonar y el gasto cardíaco¹⁷.

6. Tratamiento en recién nacidos

El Óxido nítrico inhalado (iNO) y la Oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) son los únicos tratamientos conocidos universalmente y aceptados para abordar la Hipertensión Pulmonar Neonatal,²⁷ nacidos a término y a corto plazo con insuficiencia respiratoria hipóxica que no responde a otro tratamiento ²⁴. El uso de iNO reduce la necesidad de ECMO (Oxigenación por Membrana Extracorpórea) y parece ser el único vasodilatador pulmonar selectivo para el que se dispone de pruebas de eficacia²⁵. A su vez, la falta de efecto sobre la hemodinámica sistémica, además de la seguridad relativa que otorga la administración monitoreada adecuadamente, y la carencia de secuelas significativas del desarrollo neurológico a largo plazo respaldan el uso de iNO en lugar de otros vasodilatadores. Por lo tanto, resulta pertinente instituir la terapia para aquellos que están gravemente enfermos y el establecimiento de la terapia puede prevenir la progresión a una mayor gravedad de la enfermedad^{26,27}. No obstante, el iNO resulta ser un tratamiento costoso, generando un incremento significativo de costos a la institución que lo requiere, pero al mismo tiempo es la alternativa de mayor efectividad en evitar muertes o casos de oxigenación extracorpórea^{25,26}.

El tratamiento por medio de la oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO), se configura como un sistema de asistencia mecánica circulatoria que se administra por medio de un "bypass" cardiopulmonar parcial modificado para dar soporte pulmonar y/o cardíaco por un periodo prolongado, que generalmente va de 1 a 4 semanas. Se utiliza en pacientes con falla cardiopulmonar reversible a causa de enfermedades pulmonares, cardíacas u otras. La ECMO da "tiempo" para el descanso pulmonar y/o cardíaco, y así propicia una oportunidad a la recuperación. Dado que la terapia ECMO es invasiva, acarrea riesgos potenciales, por lo que se han diseñado criterios para seleccionar pacientes con una predicción de mortalidad entre un 50% y un 100% para su intervención. El/la paciente candidato/a a ECMO ideal es quien tiene una alta predicción de mortalidad, pero con una problema pulmonar o cardiovascular potencialmente reversible²⁷²⁸.

A pesar de que el iNO, y ECMO, son los tratamientos usados universalmente, en Chile existe el uso del fármaco Sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), se presenta como un avance terapéutico indudable, pero sus efectos sobre la PAP son pequeños (reducción de aproximadamente 5 mmHg). La evidencia demuestra que una cohorte significativa de pacientes con HP no responde al tratamiento con sildenafil y, en muchos individuos, los índices de gravedad de la enfermedad no difieren del placebo aproximadamente 12 meses después de iniciado el tratamiento. Además, en los pacientes que responden bien al sildenafil, a menudo se presenta una hipotensión sistémica dependiente de la dosis que limita los efectos beneficiosos del fármaco³⁰.

Según el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), en este país, se indica que en situaciones en que no esté disponible el tratamiento con iNO, siempre y cuando,

esté activado el traslado para terapia con iNO y mientras este se espera, se sugiere utilizar Sildenafil oral. Sin embargo, se considera el riesgo de hipotensión sistémica por lo cual se deben extremar las medidas de asegurar volemia y óptimo uso de vasoactivos²⁹.

El sildenafil puede tener el potencial de mejorar los parámetros fisiológicos y disminuir la mortalidad entre los recién nacidos con hipertensión pulmonar en entornos donde el iNO no está disponible. Sin embargo, la seguridad y eficacia de sildenafil para el tratamiento de HPPN aún no se ha establecido en grandes ensayos aleatorizados, realizados a la fecha, y el sildenafil debe usarse solo en el contexto de ensayos controlados aleatorizados, por lo que su uso debe limitarse a puntuales excepciones³⁰.

7. Diagnóstico

El diagnóstico de HAP es complejo, por lo que se sugiere complementar el estudio inicial (el que consiste en la detección de fatiga, palpitations y dolor torácico en el recién nacido), con una amplia batería de exámenes de laboratorio e imágenes³¹. Los exámenes básicos necesarios, previos a la derivación a un centro de referencia donde se realizará el examen confirmatorio, cateterismo derecho, consisten en, radiografía de tórax, gases en sangre y ecocardiografía²⁹. La confirmación del diagnóstico se llevará a cabo en un centro especializado, mediante cateterismo cardiaco derecho y medición de Presión Arterial Pulmonar (PAP) Media y Gasto Cardiaco (GC)^{32,33}.

El cateterismo derecho proporcionará la medición del gasto cardíaco por termodilución. Además, debe llevarse a cabo la toma de muestras para oximetría (vena cava superior, arteria pulmonar y muestra sistémica), lo que permitirá descartar la presencia de cortocircuito intracardiaco. De manera paralela, el cateterismo cardíaco permitirá realizar la prueba de reactividad vascular pulmonar para identificar a aquellos pacientes con HAP idiopática³³. La evidencia presentada indica que tres variables PAPm, GC y pO₂, no obstante, existen otras que no son consideradas, por ejemplo, trabajos pulmonares, pH, presión parcial de CO₂, entre otras. Estas variables podrían ayudar a perfeccionar el diagnóstico médico, otorgando mayor cantidad de antecedentes, y a la vez poder mejorar la clasificación, propiciando la celeridad con la que se diagnostica la hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido.

Durante los últimos años se ha masificado la investigación con el *Machine Learning*, una novedosa técnica que permite través de algoritmos, identificar patrones en datos masivos para poder generar predicciones. Es por esto que el uso de esta técnica permitiría incluir todas las variables cardiopulmonares no involucradas, y encontrar patrones que permitan ayudar una mejor clasificación de la hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido.

8. Modelo de estudio, neonato ovino

Es innegable el aporte de los modelos animales a la comprensión tanto de la fisiología humana como de la fisiopatología de las enfermedades. Gran parte de la investigación bajo este tipo de modelo se ha llevado a cabo por medio del estudio

en roedores. No obstante, el uso de especies animales más grandes, en diversas acciones, se vuelve necesario, debido al reconocimiento general de que las observaciones experimentales en animales grandes pueden resultar más representativas de las condiciones humanas. A raíz de esto, los corderos figuran como un modelo de elección para estudiar la respiración neonatal normal y anormal. Existe evidencia de estudios realizados en corderos fetales, prematuros y a término que han propiciado una adecuada comprensión de la respiración neonatal, permitiendo que con estas investigaciones se pueda responder a un mejor cuidado de los recién nacidos con trastornos respiratorios. La gestación es similar en ambas especies, pues las gestaciones normalmente son unigestas, siendo rara vez observada la presencia de gestaciones múltiples. Otro factor significativo, es que, su peso de nacimiento y la madurez cardiovascular es comparable al del recién nacido humano, así como también su tamaño, que es adecuado para todo el arsenal terapéutico utilizado en cuidados intensivos se puede adaptar fácilmente al cordero, convirtiéndolo en un modelo de investigación traslacional pertinente³⁴³⁵.

Otro factor para considerar es que resulta muy útil en el ensayo de técnicas quirúrgicas, medición de determinados parámetros respiratorios y otras actuaciones que no se pueden llevar a cabo en roedores. Todas estas significativas ventajas hacen de la oveja un animal óptimo especialmente en la investigación de algunas patologías respiratorias³⁴. Con respecto a la maduración neonatal se han realizado diversos experimentos en corderos para analizar³⁶ también se ha estudiado la fisiopatología de la obstrucción bronquial aguda y del síndrome de dificultad respiratoria del adulto, cuando este ha sido provocado tras inhalación masiva de humo y aire caliente³⁷. Además, se ha desarrollado un modelo de síndrome de

dificultad respiratoria neonatal (SDRN) que trabaja con corderos prematuros y permite la investigación de la regulación de las proteínas del surfactante³⁸, el cual ha favorecido con sus hallazgos el desarrollo de nuevas terapias como el surfactante nebulizado, vasodilatadores, sistemas de ventilación mecánica u oxigenación mediante membrana extracorpórea³⁴.

Existe el antecedente de una investigación llevada a cabo en Chile, la cual consistió en una exposición perinatal a hipoxia crónica que indujo una hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido. Este estudio analiza las consecuencias de hipoxia crónica a gran altitud durante la gestación y poco después del nacimiento en respuestas vasculares pulmonares y femorales en ovejas recién nacidas. Tierras bajas (580 msnm) y corderos recién nacidos de las tierras altas (3.600 msnm)¹³.

Por lo tanto, la investigación plantea que los ovinos gestados y nacidos en tierras altas, presentan características fisiopatológicas similares a las de un recién nacido con Hipertensión Pulmonar, afirmación que se comprueba al analizar las variables cardiopulmonares, y los cambios estructurales y funcionales en los lechos vasculares pulmonares y sistémicos. De acuerdo con lo expuesto y considerando que Chile es un laboratorio natural, ya que cuenta con diferentes alturas a largo del país, es que resulta pertinente modelar una de las causas de hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido.

Esta investigación se realizará a partir de los datos del estudio mencionado anteriormente, por consiguiente, cuando se mencione animales de tierras altas, estos representarán a aquellos individuos que presentan un cuadro de Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido y los animales de tierras bajas representen a aquellos individuos que nacen sanos. Además de cuando se comente

sobre individuos en estado de hipoxia, representan aquellos recién nacidos con Hipertensión Pulmonar que sufren una crisis respiratoria y los de estado basal a los recién nacidos sanos con una crisis respiratoria.

9. Machine Learning

Machine Learning (ML) es una rama de la inteligencia artificial (IA), la cual se caracteriza por tener la capacidad de analizar grandes cantidades de datos con el objetivo de poder generar patrones de clasificación y respuesta, con el objeto de extraer patrones significativos a partir de diferentes tipos de datos³⁹. Además, puede determinar si se dispone de una gran cantidad de información sobre un problema, cual es la acción "correcta" a seguir, sin que el mecanismo de elección se encuentre previamente programado⁴⁰.

Se define *Machine Learning* (ML) tanto a la disciplina académica como al conjunto de técnicas que permiten realizar tareas complejas de análisis antes mencionados. Como disciplina académica, abarca elementos de matemáticas, estadística e informática, además es la herramienta que permite optimizar e impulsar los avances en el desarrollo de la inteligencia artificial. Se utiliza frecuentemente, tanto en la academia, como en la industria para impulsar el desarrollo de "productos inteligentes" con la capacidad de realizar predicciones precisas utilizando diversas fuentes de datos⁴¹. Finalmente se configura como un interesante campo de investigación de las distintas ciencias e ingenierías de la computación. A modo de ejemplo, si un algoritmo se aplica a un conjunto de datos como, imágenes de tumores y a algún conocimiento sobre estos datos como tumores benignos o malignos, entonces el sistema de algoritmos puede aprender de los datos de

entrenamiento y aplicar estos aprendizajes para hacer una predicción en este caso, si una imagen diferente representa tejido tumoral benigno o maligno³⁹

La metodología de ML ha llamado mucho la atención de manera reciente en el campo de la biomedicina por su potencial utilidad, ya que pueden aplicarse con éxito a grandes volúmenes de datos para el descubrimiento y aplicación de conocimiento, así como a la realización de predicciones a partir de él ⁴⁰. Se puede afirmar que existen dos áreas que pueden beneficiarse de la aplicación de técnicas del *Machine Learning* en el campo de la medicina, estas son el diagnóstico y la predicción de resultados. Esto incluye la posibilidad de identificar un alto riesgo de emergencias médicas, como una recaída o la transición a otra enfermedad⁴¹.

Las técnicas de ML se pueden clasificar en tres categorías principales (Fig.1), y dependen de su valor de salida, es decir del producto que se obtiene una vez hecho el análisis⁴¹. El primero es el aprendizaje no supervisado, el que consiste en utilizar registros de datos no clasificados para identificar y determinar si existen patrones latentes existentes, lo que puede generar tanto respuestas, como preguntas, que no fuesen planteadas por los investigadores, también se ocupa del agrupamiento y la reducción de la dimensionalidad.

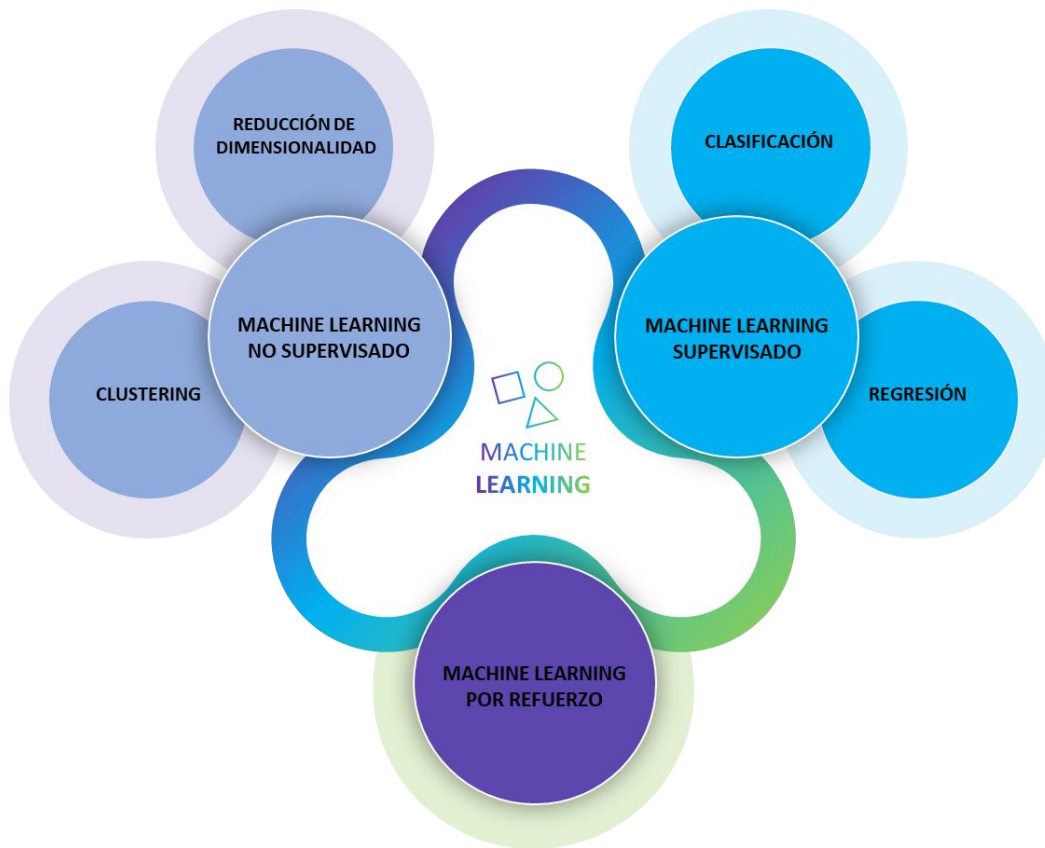


Fig. 1 Tipos de *Machine Learning*⁷²

Los patrones reconocidos en el aprendizaje no supervisado comúnmente deben evaluarse para determinar su utilidad⁴². Este tipo de aprendizaje no implica un resultado preestablecido, aquí los patrones se originan mediante algoritmos sin ninguna intervención del/la investigadora/a. Por lo tanto, las técnicas no supervisadas tienen un carácter exploratorio y se requieren para encontrar patrones o grupos indefinidos que se generan dentro de los conjuntos de datos. Estas se denominan técnicas de reducción de dimensiones e incluyen procesos tales como, el Análisis de Componentes Principales (PCA), el análisis de Dirichlet latente y Agrupamiento Jerárquico de Conglomerados (HCA). El aprendizaje no supervisado, los datos se procesan con el objetivo de separar las imágenes en grupos, la

diferencia radica en que esto se lleva a cabo, sin que el sistema de algoritmos reciba información sobre cuáles son los grupos. El sistema de algoritmos determina cuántos grupos hay y cómo se separarán⁴¹. La segunda categoría es el aprendizaje supervisado, esta consiste en técnicas en las que un modelo se entrena en una variedad de entradas (o características) que están asociadas con un resultado conocido/esperado. En medicina, esto se puede aplicar al representar el entrenamiento de un modelo para relacionar las características de una persona, con un resultado determinado (como por ejemplo asociar factores de riesgo, como la mala alimentación y el estilo de vida sedentario, con el desarrollo de una hipertensión arterial). Una vez que el algoritmo se entrena con éxito, será capaz de realizar predicciones de resultados cuando se aplique a nuevos datos. Las predicciones que se realizan por medio de modelos entrenados mediante el aprendizaje supervisado pueden ser discretas, como, por ejemplo, positivas o negativas o continuas, como una puntuación de 0 a 100³⁹. Uno de los métodos usados en el aprendizaje supervisado es la regresión de los Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), el cual consiste en combinar la reducción de dimensionalidad y la creación del modelo que transforma las variables independientes en dependientes. Funciona, como el Análisis de Componentes Principales (PCA), mediante la creación de nuevas variables que correspondan a la proyección de las variables independientes y dependientes en nuevas direcciones, sin embargo, estas nuevas direcciones se calculan para maximizar la covarianza entre variables dependientes e independientes, lo que no es el caso en PCA⁴³. El aprendizaje supervisado, cuenta con características relacionadas con el objetivo de la investigación y las medidas de resultados deseados/esperados que se deben lograr, esto con la intención de

identificar los vínculos entre esos dos en el conjunto de datos⁴². El selector elige cuáles serán las características identificables del conjunto de datos que luego se pueden representar en una matriz numérica y analizarlas en el algoritmo⁴¹.

Finalmente, el Aprendizaje por Refuerzo intenta conseguir que una inteligencia artificial aprenda a decidir mediante su propia experiencia. Es decir, que ante una situación determinada, sea capaz de seleccionar por sí misma la mejor acción a ejecutar en ese momento mediante un proceso interactivo de prueba y error a base de reforzar positivamente cada vez que se aproxima o logra objetivo. La aplicación de este aprendizaje les permite reconocer caras, clasificar secuencias de ADN, conducir vehículos, o hacer diagnósticos médicos.

Evidencia que sustenta la hipótesis

En Chile no está claro el porcentaje de recién nacidos con HPPN. Es así como en el año 2020 un estudio realizado en Chile indica que los recién nacidos con problemas respiratorios son diagnosticados como Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) y a la fecha no existen datos actualizados respecto a la prevalencia del (SDR) ni el porcentaje atribuible a cada etiología⁴⁴, entendiendo que entre las causas de SDR está la HPPN, es por esto que la HPPN podría estar encubierto como distrés respiratorio, lo que en consecuencia indica que los tratamientos no serían los adecuados, pudiendo aumentar así la mortalidad neonatal.

Además de esto, para el diagnóstico de la HPPN, se considera el análisis de solo tres variables cardiopulmonares, las que son Presión Arterial Pulmonar Media (PAPm), Gasto Cardíaco (GC) y Presión Parcial de Oxígeno (pO_2), quedando fuera muchas otras variables, como por ejemplo trabajos pulmonares pH, Frecuencia Cardíaca (HR), Resistencia Vascular Sistémica (RVS), entre otras. Estas variables podrían aportar a una mejor clasificación de HPPN, lo que tal como se expuso anteriormente permitiría robustecer el diagnóstico médico, además de otorgar celeridad al mismo. Esto, por medio de la utilización de *Machine Learning*, que mediante diferentes técnicas no supervisadas permitirá crear patrones, análisis multivariados de las variables no consideradas, mejorando la clasificación, y en consecuencia un mejor tratamiento.

Por lo tanto, proponemos la siguiente hipótesis

Variables morfofisiológicas, no consideradas en el diagnóstico clínico actual tienen una influencia en el desarrollo de Hipertensión Pulmonar Neonatal en modelo ovino.

I. Objetivo general:

Identificar la incidencia de variables morfofisiológicas no consideradas en la evaluación diagnóstica de hipertensión pulmonar neonatal en modelo ovino mediante *Machine Learning*

II. Objetivos específicos:

- Describir las variables morfofisiológicas de neonatos ovinos expuestos a hipoxia crónica y aguda.
- Analizar la correlación de variables morfofisiológicas seleccionadas con el desarrollo de hipertensión pulmonar neonatal.
- Analizar la similitud entre variables de estudio e individuos según altura y oxigenación
- Establecer la influencia de las variables morfofisiológicas no consideradas en el desarrollo de Hipertensión Pulmonar Neonatal

MATERIALES Y MÉTODOS

Comité de Bioética

Todo el cuidado, mantenimiento, procedimientos y la experimentación se realizó de acuerdo con las Ley de 1986 sobre animales (procedimientos científicos) del Reino Unido, y los principios rectores de la *American Physiological Society* para investigaciones que involucran animales y seres humanos (*American Physiological Society*, 2002) y fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales de experimentación utilizados en Proyectos Fondecyt Regular 1010636, 1050479, 1080663, 1090355 y 1130424, que fueron ejecutados entre los años 2001-2016. Período en el cual se recolectaron las muestras para histología, estudios bioquímicos y moleculares. Todos los procedimientos experimentales realizados con animales previos a este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, CBA Ns° 097, 0232, 0282, 0476 y 0561⁴⁵.

Animales

Se utilizaron registros y variables morfofisiológicas de ovinos recién nacidos gestados, nacidos y mantenidos a nivel de mar expuestos a la normoxia, y neonatos gestado, nacidos y mantenidos en las grandes altitudes del altiplano andino, sometidos a la hipoxia crónica, ambos grupos de neonatos se estudiaron en condiciones basales y de hipoxia sobreagregada. Ovejas recién nacidas de tierras

bajas en ambos estados (n=15) (TB edad $10 \pm 0,8$ días, peso = $6,7 \pm 0,4$ kg) y en tierras altas en ambas condiciones (n=13) (TA edad $12 \pm 0,92$ días, peso = $6,2 \pm 0,5$ kg). A nivel del mar se estudiaron en dos localidades, la primera en Santiago, con una altitud de 580 msnm y una presión barométrica de 710 (mmHg) y en Lluta con una altitud de 250 msnm, y una presión barométrica cercana a las 750 mmHg; y en Putre, a una altitud de 3.600 msnm con una presión barométrica de 480 (mmHg).

Mediciones Fisiológicas *in vivo*, Preparación experimental y Procedimientos quirúrgicos.

El efecto de la hipoxia fetal crónica en la circulación pulmonar postnatal fue estudiado en los neonatos de ovejas concebidos, gestados y nacidos en el altiplano andino. Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de la Estación Experimental Putre, del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), Universidad de Chile, en la localidad de Putre, a 3.600m de altitud. Se utilizó la preparación experimental de recién nacido de oveja crónicamente instrumentado. Alrededor del quinto día después del parto, los corderos bajo anestesia general (ketamina $5-10 \text{ mg.kg}^{-1}$ I.M. + xilacina $0,04 \text{ mg.kg}^{-1}$ I.M.), se les instaló catéteres de polivinilo en aorta descendente y vena cava inferior, vía arteria tibial posterior y vena tibial recurrente, respectivamente. Estos catéteres fueron llenados con heparina 500 U.I., y posteriormente se ocluyeron con un sello de cobre. Ambos catéteres fueron exteriorizados por el flanco del RN, para ser ubicados en un bolsillo de género suturado a la piel. Además, un catéter Swan-Ganz fue instalado en la arteria pulmonar, vía arteria yugular externa; éste fue llenado con heparina 1000 U.I. y

sellado para luego dejarlo cubierto por una bufanda de cuello elástica para proteger el catéter. Durante los días posteriores a la cirugía, fue administrado metamizol sódico como analgésico (10 mg.kg^{-1}), y ampicilina (10 mg.kg^{-1}) de manera profiláctica durante 3 días¹³. Esta intervención se realizó a los 3-4 días de vida en los recién nacidos. Durante el período post operatorio, diariamente fue administrado metamizol sódico como analgésico (10 mg.kg^{-1}), y Ampicilina (10 mg.kg^{-1}) de manera profiláctica durante 5 días¹³.

Protocolo Experimental *in vivo*.

El protocolo experimental consistió en 7 días totales, que abarca la cirugía de instrumentación, el postquirúrgico, el experimento de hipoxia aguda sobreagregada, y al final del cual los animales fueron eutanizados para colección de tejidos.

Protocolo de hipoxia sobreagregada.

Estos protocolos buscan identificar la respuesta de la circulación cardiopulmonar y la circulación sistémica al someter al individuo a una hipoxia sobreagregada. Se basaron en un protocolo experimental consistente en 3 horas (h): 1h basal, durante la cual los neonatos respiraron aire ambiental; 1h de hipoxia, durante la cual los recién nacidos respiraron una mezcla de aire, nitrógeno y dióxido de carbono; y 1h de recuperación, donde volvieron a respirar aire ambiental. La inducción de la hipoxia se obtuvo haciendo respirar al neonato de oveja una mezcla gaseosa de O_2 ,

N₂ y CO₂, disminuyendo la fracción inspiratoria del oxígeno, llegando a una PO₂ aórtica de aproximadamente de 30 mmHg (Figura 2)¹³

Durante el período experimental, se registró la Presión Arterial Pulmonar (PAP) y sistémica (PAS) en forma continua, mediante transductores de presión conectados con un sistema de adquisición de datos Powerlab 8SP (ADInstruments, Adelaide, Australia) (Figura 2). Se midieron los gases sanguíneos, pH, Porcentaje de Saturación de la Hemoglobina por O₂, concentración de la hemoglobina, carboxihemoglobina y contenido de O₂ en sangre de aorta y arteria pulmonar en forma intermitente (Synthesis IL25, Instruments Lab, USA) (Figura 2). A la vez, se determinó el Gasto Cardíaco (GC) mediante termodilución (COM2, Baxter; USA) (Figura 2)^{46,13}. Además, se calculó de manera continua la Frecuencia Cardíaca (HR) del trazado de Presión Arterial Sistémica y de manera intermitente la Resistencia Vasculat Pulmonar (RVP) y Sistémica (RVS). Se midieron los gases sanguíneos, pH, % de Saturación de la Hemoglobina (%Sat), Concentración de la Hemoglobina, metahemoglobina y Contenido de O₂ (Cont O₂) en sangre en forma intermitente (Fig.2). A la vez, se determinó el Gasto Cardíaco (GC) mediante termodilución (Fig.2)^{13,46}. Además, a partir de las variables determinadas anteriormente, se calcularon las siguientes variables, mediante las siguientes formulas:

$$\text{Volumen Expulsivo (VE)} = \frac{\text{Gasto Cardíaco}}{\text{Frecuencia Cardíaca}}$$

$$\text{Trabajo Sistémico medio (Wsist)} = \text{PAM} \times \text{VE}$$

$$\text{Trabajo Pulmonar media (Wpulm)} = \text{PAPm} \times \text{VE}$$

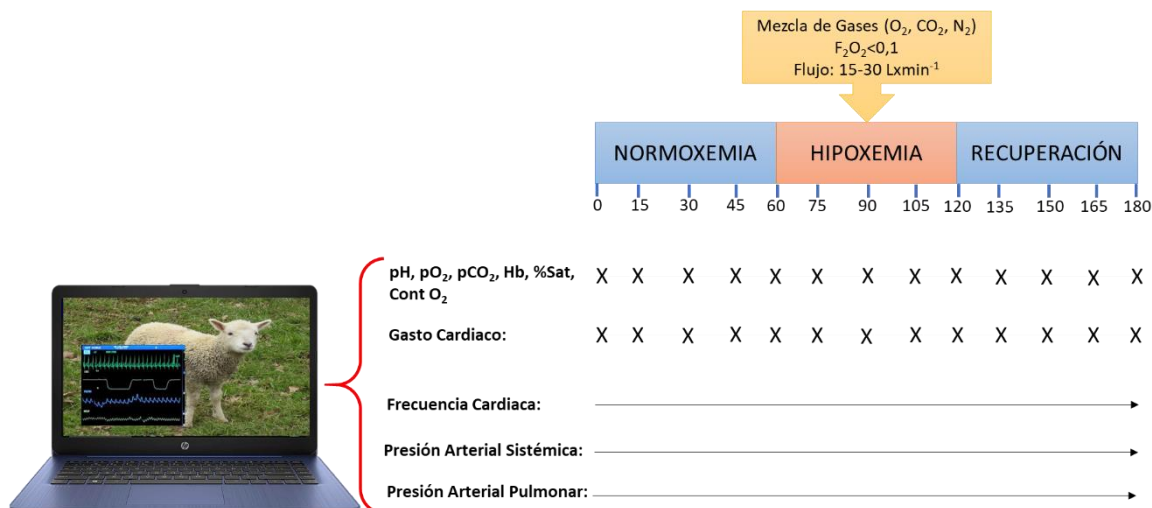


Fig.2 Protocolo experimental hipoxia aguda sobre-agregada

Análisis y correlación de datos por Estadística Monovariada - Objetivo

Específicos 1 y 2

El análisis estadístico de las mediciones fisiológicas donde se compararon la respuesta de las variables cardiopulmonares de los corderos de ambas altitudes, en ambas condiciones, fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías desapareado seguido de un post test (post hoc) de Benjamini. Se consideró significativo un valor de p igual o menor que 0,05⁴⁷. Se utilizó el método para la corrección y el ajuste de las comparaciones múltiples de las todas las variables de los grupos de tierras bajas en ambos estados (basal-hipoxia) y tierras altas (basal-hipoxia). Todos los análisis estadísticos fueron realizados por medio del software GraphPad Prism (versión 8.0.1).

Machine Learning

Para el análisis multivariado de las variables clínico-antropométricos se procesarán los datos en tres etapas: un pretratamiento, que buscará remover fuentes de variación no deseables entre muestras y entre variables; y el análisis de reconocimiento de patrones; que involucrará el uso de métodos no-supervisados y supervisados. Para el caso de los métodos no supervisados se utilizarán los métodos de Análisis Jerárquico de Conglomerados o HCA (por sus siglas en inglés: *Hierarchical Cluster Analysis*) y Análisis de Componentes Principales o PCA (por sus siglas en inglés: *Principal Component Analysis*). Finalmente, los datos serán analizado mediante el método supervisado Mínimo Cuadrados Parciales o PLS (por sus siglas en ingles *Partial Least Squares*), utilizando los *software Excel (Microsoft versión 11.0, USA)* y *Pirouette (infometrix versión 3.11)*

Análisis de datos mediante Machine Learning: Aprendizaje No Supervisado-

Objetivo Específico 3

Esta metodología pretende analizar la similitud entre variables de estudio e individuos según altura y oxigenación. La división de los animales se hará en el grupo de tierras altas-tierras bajas, periodos de hipoxia- basal y finalmente de analizaran los grupos de tierras bajas-basal (TBB), tierras altas-basal (TAB), tierras bajas-hipoxia (TBH) y tierras altas-hipoxia (TAH). Para esto se utilizarán 2 herramientas de estadística multivariadas HCA y PCA. En ambos análisis se aplicó un pre-procesamiento de datos, en este estudio el pre-procesamiento que se

utilizará es la autoescala que consiste en un centrado de la media seguido de un escalado de la varianza. Debido a que al tener las variables diferentes magnitudes esto puede afectar el peso de ellas en los cálculos multivariados. Este análisis es determinado mediante la siguiente fórmula:

$$Xs = \frac{X - \text{media}}{ds}$$

Donde X corresponde a la variable, ds a la desviación estándar.

En el análisis jerárquico de conglomerados (HCA), las distancias entre pares de muestras (o variables) se calculan y comparan. Cuando las distancias entre muestras son relativamente pequeñas, implica que las muestras son similares, al menos con respecto a las variables ingresadas en la matriz de datos. Mientras tanto, las muestras diferentes estarán separadas por distancias relativamente más grandes. Conocido también en ciencias biológicas como taxonomía numérica, HCA agrupa los datos en grupos que tienen atributos similares

El propósito principal de HCA es presentar los datos de una manera que enfatice las agrupaciones. En contraste con las técnicas que agrupan las muestras en categorías preexistentes (grupos de individuos o variables ya clasificados según una condición) , HCA busca definir esas categorías en primer lugar. La presentación de los resultados de HCA en forma de dendrograma facilita el reconocimiento visual de tales categorías. HCA puede centrarse en muestras o variables. La agrupación de muestras revela similitudes entre las muestras, mientras que la agrupación de variables señala relaciones Inter variables. Esta similitud se determina calculando

las diferencias en cada una de las variables (m) y se realiza mediante la fórmula de Distancia Euclidiana:

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_i^m (x_{aj} - x_{bj})^2}$$

Donde d_{ab} corresponde a la distancia entre dos individuos, x_{aj} corresponde al conjunto de variables del individuo a y x_{bj} al conjunto de variables del individuo b

Una vez calculadas las distancias entre todos los pares de muestras, las dos muestras con mayor similitud son vinculadas. Una vez que un grupo está vinculado a otro grupo, forman un solo grupo nuevo grupo. Una vez determinadas las distancias entre este nuevo grupo y todos los demás grupos existentes, se busca nuevamente la distancia entre grupos más pequeña y se forma otro vínculo. Este proceso continúa hasta que todas las muestras / grupos están vinculados. El método de vínculo utilizado fue el incremental el cual se utiliza la suma de los cuadrados para calcular el vínculo entre los grupos, dicho método evita el entrecruzamiento de las ramas del dendrograma y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$d_{AB} = C \left(\frac{(n_A + n_C)d_{AC}^2 + (n_B + n_C)d_{BC}^2 - n_C d_{AB}^2}{n_A + n_B + n_C} \right)^{1/2}$$

Donde d_{AB} corresponde a la distancia entre un conglomerado de individuos AB aun nuevo individuo C,

De acuerdo con la bibliografía el conjunto de datos se considera agrupado correctamente o correlacionado cuando el porcentaje de similitud es mayor a un 40% que equivale a 0,4 en las gráficas. Los análisis matemáticos se encuentran en el anexo 1.

El **Análisis de Componentes Principales (PCA)**, es una herramienta de análisis multivariado y representa gráficamente las relaciones entre muestras y variables. Además de reducir la dimensionalidad de las variables, mostrando aquellas que están directamente relacionada con la distribución de los datos, en este caso los animales. Los **componentes Principales (PCs)** generados por el análisis son una nueva variable vectorial normalizada de la matriz de covarianza y se ordenan según la cantidad de variación presente en los datos que contienen⁴⁸.

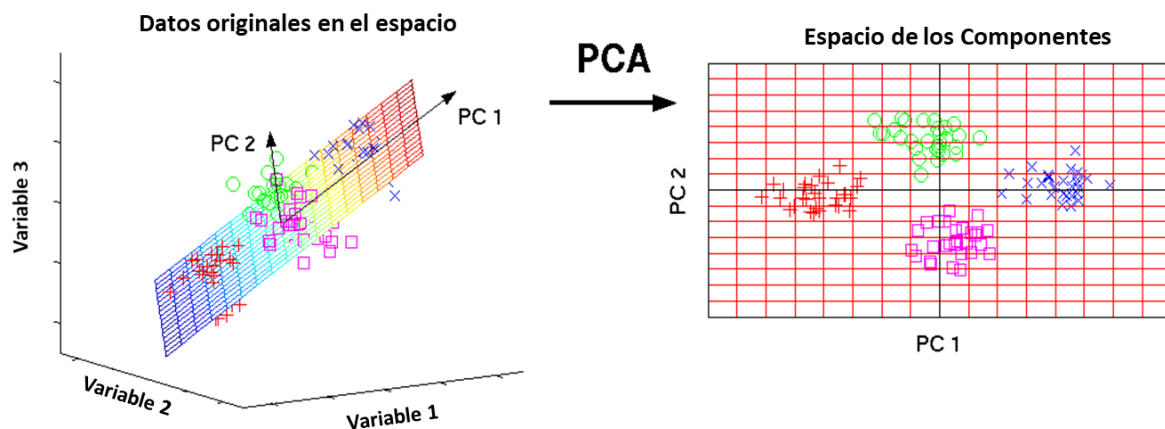


Fig.3 Análisis de Componente Principales

Cada PC generado es ortogonal en el espacio (90 grados) con respecto al otro, por eso es imposible graficar más de tres componentes en un plano tridimensional, por ello en general para compararlos se utilizan dos con el fin de poder visualizar de mejor manera la formación de grupos espontáneos en nuestras muestras (Fig.3). El primer PC es la línea que minimiza la suma de los cuadrados de la distancia de cada punto de la muestra a la línea. Así, la dirección del primer factor se alinea con la mayor dispersión de los datos. El eje del segundo factor debe ser perpendicular al primero y su dirección está dictada por la búsqueda de otra línea que describa la variación restante de los datos, quiere decir que el primer componente principal (PC) cubre la varianza máxima y cada componente que le sigue cubrirá un valor de varianza menor. Cabe señalar que no se utiliza el PC con mayor varianza, sino aquel que genera una mejor diferenciación en nuestros grupos de interés en nuestra matriz de datos.

Para determinar cuáles PCs son importantes para nuestra distribución muestral se utiliza el método del codo, en este se genera a partir de un análisis de PC versus

varianza, identificándose de manera visual una variación brusca en el valor de estas, la cual se observa como un codo la gráfica. Así pues, se consideran de baja relevancia aquellas componentes cuya varianza queda por debajo del codo. Posteriormente, se observa la distribución de los individuos y su agrupamiento/separación, según nuestra variable de interés a observar. Los *scores* se muestran cómo la ubicación de puntos de datos en el espacio de la variable original puede expresarse en términos de los dos nuevos ejes, PC1 y PC2, por lo que el gráfico de *scores* representa las diferencias y similitudes entre muestras y sirve para buscar agrupamientos entre las mismas.

Posteriormente se determina cuánto contribuye cada variable original a cada PC de interés determinado por el gráfico de “*scores*”, esta contribución de las muestras sobre los PC se denomina “cargas o *loadings*”. Por lo tanto, a través del gráfico de *loadings* se puede determinar la correlación multivariada entre las variables que son capaces de generar una separación de interés de los individuos. Cada variable tiene un valor de *loadings* en cada PC, el cual indica en qué extensión esa variable contribuye a ese PC.

Es importante tener en mente que cuando dos variables presentan altos valores *loading* en el mismo PC, entonces estas variables están altamente correlacionadas con el comportamiento observado en los *scores*, es decir ambas contribuyen a un fenómeno común.

Con el objeto de facilitar la observación y comparación entre los valores de *loading* entre los distintos PCs se realizó un gráfico de calor a partir de los *loadings*. El gráfico se dividirá en rectángulos o cuadrados, donde cada uno de los cuales

representará a las celdas de la tabla de *loadings*. El rectángulo o cuadrado está codificado por colores de acuerdo con el valor de las celdas correspondientes.

Análisis de dato mediante *Machine Learning*: Aprendizaje Supervisado-

Objetivo Específico 4

Con el objeto de establecer una correlación multivariada entre variables medidas y la estimación de la Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido (HPPN), se realizó un análisis de regresión supervisada (PLS). La regresión establece una relación funcional entre alguna propiedad cuantitativa de la muestra, la variable dependiente y una o más variables independientes. En comparación con la regresión univariante, los métodos multivariados ofrecen una precisión mejorada, una detección de valores atípicos más sofisticada y en el caso de los algoritmos basados en factores, la posibilidad de compensar las interferencias. Si bien se puede utilizar como modelos descriptivos, el objetivo final es realizar un modelo predictivo preliminar con los datos observados. La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) comparte muchas características y vocabulario de PCA. PLS (también conocido como Proyección a estructuras latentes) encuentra factores análogos a Componentes Principales de PCA, con la diferencia que es capaz de obtener una regresión lineal derivada de los mejores componentes principales con el fin de definir una variable dependiente a partir de las otras variables. En este caso, ya que nuestro objetivo es determinar un posible diagnóstico alternativo para hipertensión pulmonar, las mediciones de presión pulmonar y sus cálculos derivados serán excluidos de la base de datos y presión arterial pulmonar (PAP)

será convertida en una variable dependiente. Con esto, se realizará un modelamiento supervisado con el fin de encontrar la mejor ecuación que sea capaz de modelar o predecir la PAP a partir del resto de las variables morfofisiológicas. El vector final optimizado puede representar uno o más componentes principales⁴³. Como paso final de hacer una validación cruzada de la estimación de PAP de la regresión lineal versus el valor real obteniéndose la bondad de ajuste de la curva y mediante una matriz de confusión los valores de **Sensibilidad**, los que corresponden a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con la condición adversa pulmonar por la prueba diagnóstica. Se determina mediante la siguiente fórmula:

$$Se = \frac{\text{Muestras correctamente clasificadas con la condición adversa}}{\text{Total de muestras con la condición adversa}}$$

Posteriormente se determina la **Especificidad**, la que consiste en la proporción de individuos correctamente diagnosticados con ausencia de la enfermedad por la prueba diagnóstica. Pudiendo determinarse a través de la siguiente fórmula:

$$Es = \frac{\text{Muestras correctamente clasificadas sin la condición adversa}}{\text{Total de muestras sin la condición adversa}}$$

Finalmente se determinan las **razones de similitud positiva y negativa (odd ratio)** del algoritmo predictor las que describen cuántas veces es más probable que un individuo con la condición adversa tenga un determinado resultado en la prueba

diagnóstica respecto a uno sin la condición adversa, los que se determinan por medio de las siguientes fórmulas:

$$Rv (+) = \frac{\textit{Probabilidad de un resultado positivo en los pacientes con la enfermedad}}{\textit{Probabilidad de un resultado positivo sin la enfermedad}}$$

$$Rv (-) = \frac{\textit{Probabilidad de un resultado negativo en los pacientes con la enfermedad}}{\textit{Probabilidad de un resultado positivo sin la enfermedad}}$$

RESULTADOS

Análisis de Variables Cardiopulmonares

Con el objeto de determinar si existen diferencias significativas entre las medias aritméticas entre los grupos de altitud y de nivel de mar, en las diferentes condiciones basal o de hipoxemia aguda, se realizó un análisis de estadística monovariada. La **Tabla 1** muestra los valores de la media aritmética \pm el error estándar de las variables cardiopulmonares medidas en los ovinos de tierras altas y tierras bajas, en estado basal e hipoxia.

I. Análisis entre ovinos gestados en tierras bajas y tierras altas.

Al analizar los resultados entre ambos grupos pudimos observar que, al someter a los individuos a dos condiciones de oxigenación, basal e hipoxia crónica, presentaron diferencias significativas (Tabla 1, $p < 0,05$). En condiciones basales la hipoxia crónica indujo aumentos significativos en las siguientes variables PAP, PVR, W_{pulm} y pH arterial; y disminuyen respecto al basal de tierras bajas pCO_2 arterial, pO_2 arterial, Saturación de Oxígeno y Contenido Arterial de Oxígeno. Al comparar las variables cardiopulmonares de los corderos de ambas altitudes al ser sometidos a hipoxia aguda sobreagregada, se observó una disminución de las siguientes variables: Frecuencia cardiaca, pCO_2 , contenido de O_2 . Y aumentaron respecto a tierras bajas PAP, PVR, W_{pulm} y pH.

II. Análisis entre condiciones de estímulo Basal e Hipoxia sobre-agregada

Al examinar el efecto de un evento de hipoxia aguda sobre-agregada en ambos grupos experimentales, pudimos observar que las siguientes variables presentaron valores estadísticamente significativos respecto a la condición basal (Tabla 1, $p < 0,05$): en el grupo de tierras bajas disminuyeron en hipoxia aguda respecto a basal, SVR, pH, pO_2 , %Sat, Cont O_2 . Y aumentaron HR, PAP, GC, y Wpulm. Al examinar el efecto de la hipoxia crónica en la respuesta cardiopulmonar a la hipoxia sobreagregada, pudimos observar que disminuyeron pH, pCO_2 , pO_2 y Saturación de Hemoglobina. Y aumentaron HR, PAP, PVR, Wpulm.

Tabla 1. Variables Cardiopulmonares de ovejas recién nacidas de tierras bajas (TB) y tierras altas (TA), en condición basal e hipoxia.

Variable	Grupo	Basal	Hipoxia
PAM, mmHg	TB	81,02 ± 1,16	81,73 ± 1,65
	TA	81,73 ± 2,93	88,49 ± 2,16
HR, Latidos/min	TB	194,80 ± 7,15	267,60 ± 10,57 ^a
	TA	188,60 ± 12,38	219,90 ± 15,29 ^c
PAP, mmHg	TB	13,97 ± 0,49	25,04 ± 1,05 ^a
	TA	24,45 ± 1,90 ^a	38,00 ± 2,72 ^{b,c}
GC, ml x min x kg	TB	303,14 ± 24,8	410,10 ± 21,1 ^a
	TA	333,80 ± 22,76	389,70 ± 24,47
SVR, mmHg x mL ⁻¹ x	TB	0,285 ± 0,018	0,210 ± 0,009 ^a
	TA	0,262 ± 0,023	0,240 ± 0,020
PVR, mmHg x mL ⁻¹ x min	TB	0,049 ± 0,003	0,064 ± 0,005
	TA	0,077 ± 0,008 ^a	0,11 ± 0,010 ^{b,c}
pH	TB	7,424 ± 0,008	7,38 ± 0,022 ^a
	TA	7,474 ± 0,006 ^a	7,462 ± 0,013 ^c
pCO ₂ , mmHg	TB	38,69 ± 1,31	37,57 ± 1,37
	TA	32,69 ± 1,52 ^a	30,43 ± 1,06 ^c
pO ₂ , mmHg	TB	80,53 ± 1,85	30,55 ± 0,56 ^a
	TA	42,03 ± 1,55 ^a	30,24 ± 0,40 ^b
% Saturación	TB	94,97 ± 0,71	49,28 ± 3,18 ^a
	TA	71,46 ± 2,18 ^a	51,52 ± 2,01 ^b
Contenido arterial de O ₂	TB	13,44 ± 0,57	7,27 ± 0,56 ^a
	TA	11,36 ± 0,57 ^a	8,39 ± 0,57 ^{b,c}
Hb, g/dL	TB	10,51 ± 0,43	10,81 ± 0,41
	TA	12,16 ± 0,59	12,43 ± 0,60
VE, ml x kg ⁻¹	TB	1,59 ± 0,14	1,58 ± 0,13
	TA	1,82 ± 0,12	1,81 ± 0,14
Wsist, mmHg x mL x kg ⁻¹	TB	128,54 ± 11,61	130,21 ± 11,63
	TA	124,36 ± 14,58	134,87 ± 17,75
Wpulm, mmHg x mL x	TB	22,71 ± 2,74	38,80 ± 2,49 ^a
	TA	37,58 ± 5,45 ^a	59,09 ± 8,15 ^{b,c}

Variables Cardiopulmonares de ovejas recién nacidas de tierras bajas (TA) y tierras altas (TB), en condición basal e hipoxia. Los valores representan la media ± SEM de mediciones realizadas en 15 ovejas en tierras bajas (TB) y en 13 ovejas en tierras altas (TA). Significativo las diferencias son p<0,05. PAM, Presión Arterial Media; HR, Frecuencia Cardiaca, PAP, Presión Arterial Pulmonar, GC, Gasto Cardiaco; SVR, Resistencia Vascular Sistémica, PVR, Resistencia Vascular Pulmonar; pCO₂, Presión Parcial de CO₂; pO₂, Presión Parcial de O₂; % Sat O₂, Porcentaje de Saturación de Hemoglobina; ContO₂, Contenido de Oxígeno; Hb, Concentración de Hemoglobina; VE, Volumen Expulsivo, Wsist, Trabajo Sistémico; Wpulm, Trabajo Pulmonar.

^avs. Tierras bajas basal, ^bvs Tierras altas basal, ^cvs Tierras bajas hipoxia (Test de Benjamini).

Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA)

Para comprobar la presencia de grupos relativamente homogéneos en nuestra población de estudio sobre la base de características de altitud y estímulo hipóxico, realizamos análisis de agrupamiento jerárquicos no supervisados utilizando el total de individuos y variables

I. Análisis de Individuos por Altitud

Para identificar las diferentes agrupaciones espontáneas se realizó un análisis de HCA al total de corderos (n=27) (Fig.4). Para realizar esta metodología, cada ovino se presentó con ambos estados de oxigenación tanto basal como hipoxia sobreagregada. Al analizar los resultados se observaron 4 grupos, conformados de la siguiente manera por los siguientes grupos de corderos:

- **Grupo 1**, compuesto por 12 individuos de tierras bajas
- **Grupo 2**, constituido por 2 corderos de tierras bajas
- **Grupo 3**, conformado por 8 ovinos de tierras altas
- **Grupo 4**, integrado por 5 corderos de tierras altas.

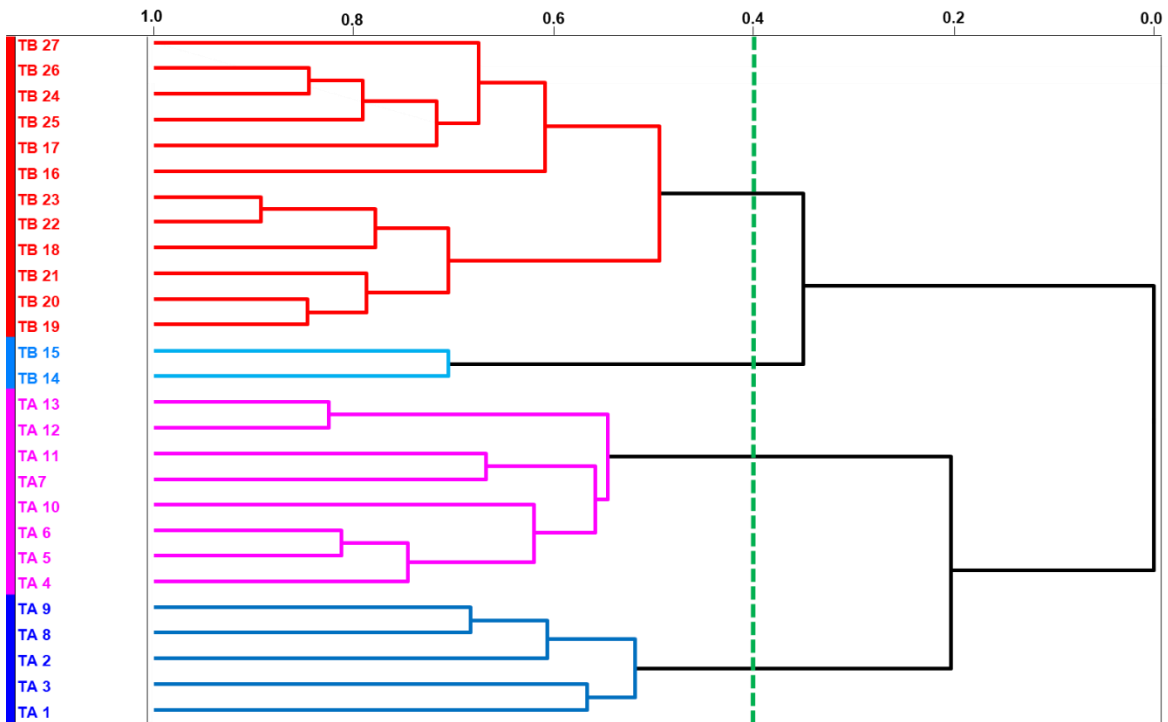


Fig.4 Análisis de Agrupamiento Jerárquico (HCA) por altitud, de todos los ovinos recién nacidos en tierras bajas y tierras altas, en estado basal e hipoxia

II. Análisis de Individuos considerando cada estímulo por separado

El segundo análisis se realizó considerando el estímulo basal e hipóxico por separado, por lo tanto, cada cordero se analizó de manera individual (n=54). En este dendrograma se identificaron tres grupos de individuos considerando la interacción de todas las variables de manera multidimensional. (Figura 5):

- **Grupo 1**, constituido por 17 individuos equivalente al 31,5%. Este grupo representado de color rojo, nos indica que de los 17 individuos que conforman este conglomerado, el 76% lo conforman individuos de tierras bajas en condiciones de hipoxia aguda, y el 11,76% lo conforman individuos de tierras bajas en estado basal y el 11,6% individuo de tierras altas en estado basal e hipóxico.

- **Grupo 2**, se conforma por 25 individuos, equivalente al 46,3%, este grupo, señalado de color celeste, está conformado por un 48% de individuos de tierras altas en estado basal, y por 48% de individuos de tierras altas en estado hipóxico, y solo el 2% está conformado por individuos de tierras bajas en condición de hipoxia.
- **Grupo 3**, compuesto por 12 individuos, representados por un 22,2%, que en su totalidad está conformado por individuos de tierras bajas en estado basal.

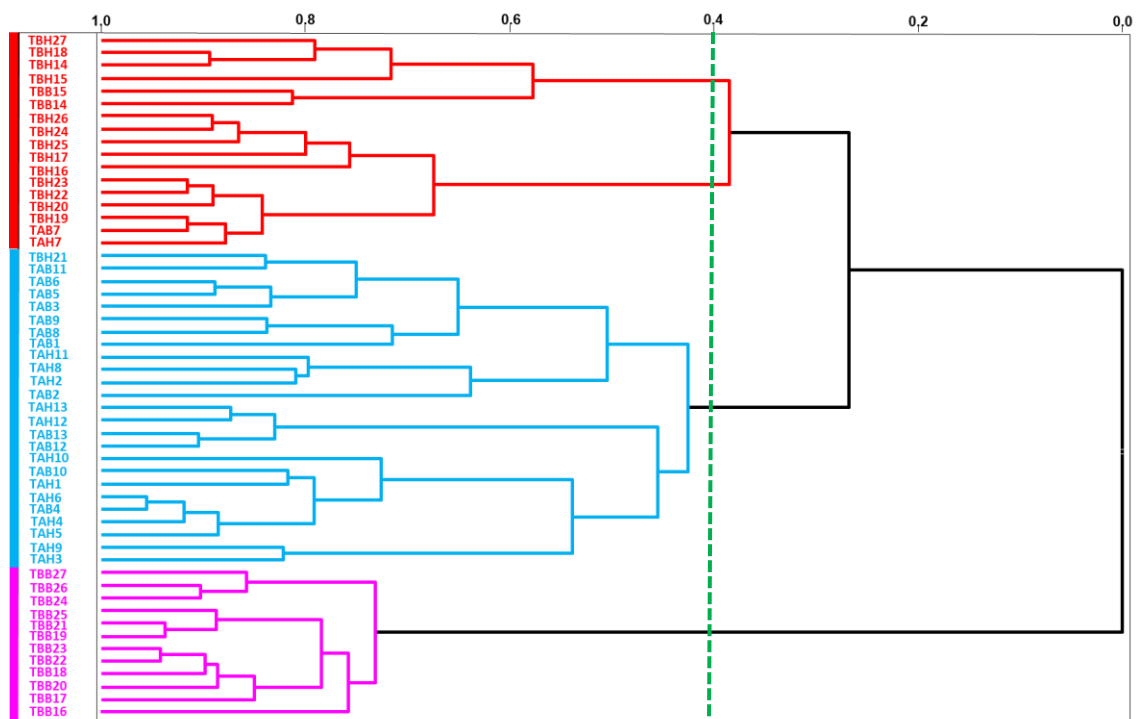


Fig.5 Análisis de Agrupamiento Jerárquico (HCA) de todos los ovinos recién nacidos en tierras bajas y tierras altas. Cada individuo se analizó de forma independiente de acuerdo con su condición. TAB, tierras altas basal, TAH, tierras altas hipoxia, TBB, tierras bajas basal, TBH, tierras bajas hipoxia.

III. Análisis de agrupación de variables según altitud

Por último, para analizar la agrupación y relación entre las variables cardiopulmonares y gases en sangre según su altitud por separado se realizó un

nuevo análisis de HCA (Fig. 6 y 7). El primer HCA se realizó a partir de los individuos de tierras bajas, y se pueden observar las siguientes variables en diferentes grupos (Fig.6):

- **Grupo 1**, Wpulm, GC, VE y PAM
- **Grupo 2**, Hb, pCO₂, PVR, PAP y HR
- **Grupo 3**, Cont O₂, %Sat, pO₂, SVR y pH.

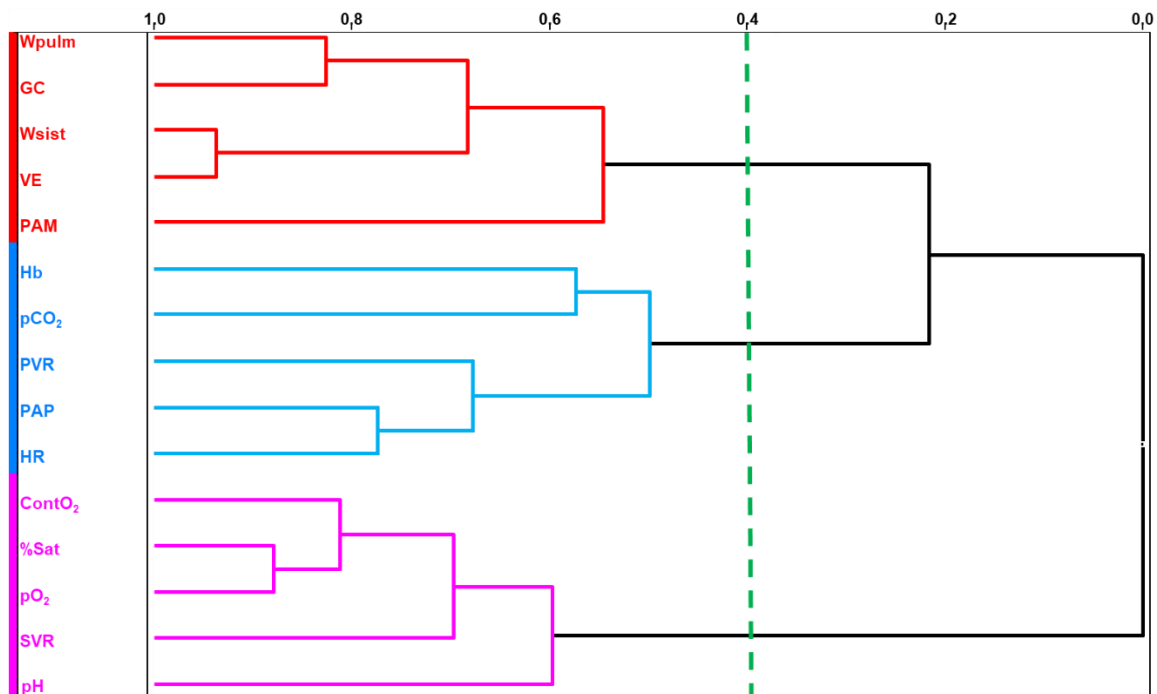


Fig.6 Análisis de Agrupamiento Jerárquico (HCA) de variables cardiopulmonares de los ovinos recién nacidos en tierras bajas, en estado basal e hipoxia.

El segundo resultado muestra la agrupación de variables según tierras altas, y se observan 3 grupos (Fig.7):

- **Grupo 1** son Wpulm, Wsist, PVR, PAP y PAM
- **Grupo 2** VE, GC y HR
- **Grupo 3**, Hb, pCO₂, SVR, CONTO₂, % Sat, pO₂ y pH

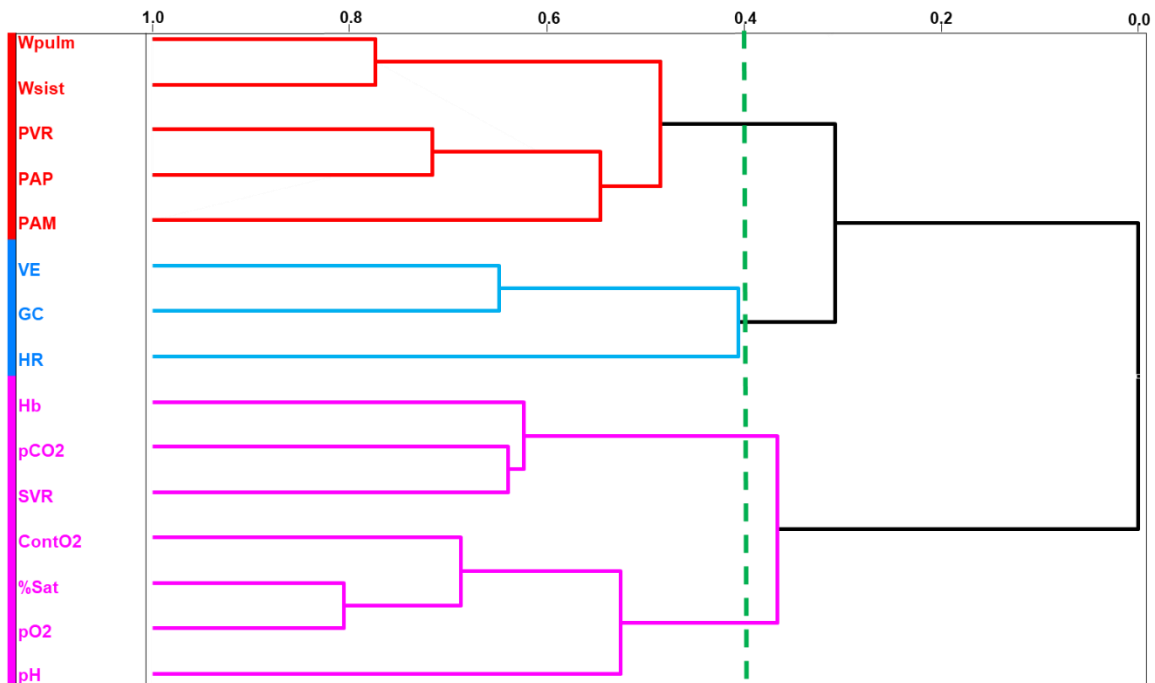


Fig. 7 Análisis de Agrupamiento Jerárquico (HCA) de variables cardiopulmonares de los ovinos recién nacidos en tierras altas, en estado basal e hipoxia.

Distribución de grupos mediante PCA

Con el objeto de encontrar asociaciones no observadas mediante la estadística tradicional, se utilizaron algoritmos de PCA para determinar tendencias a la formación de grupos espontáneos de asociación multivariada entre ovinos recién nacidos. Mediante este análisis se obtuvieron los *scores* (*puntajes*), *loadings* (*cargas*) y para cada componente principal (PC) que describe la formación de los distintos grupos (Fig.11 a, b y c).

La elección del componente principal se realizó mediante el método del codo que es la representación gráfica de las respectivas varianzas de las componentes principales, se pudo identificar de manera visual una variación brusca en el valor de estas originando un codo (curva) (Fig.8). Así pues, se consideraron de baja

relevancia aquellas componentes cuya varianza queda por debajo del codo. A partir de esto se pudo observar aquellos que contienen la mayor variación, además de que los PC se ordenaron según la cantidad de variación presente en los datos que contienen⁴⁸, sin embargo, hay ciertos casos que se observan en otros componentes principales mayores tendencias de clústeres⁴⁹, como se observa en la Fig. 9 el PC2 presenta una menor variación, pero una mejor agrupación para la altitud, sin embargo el PC1 muestra una mejor variación y formación de grupos, para la condición (Fig.10).

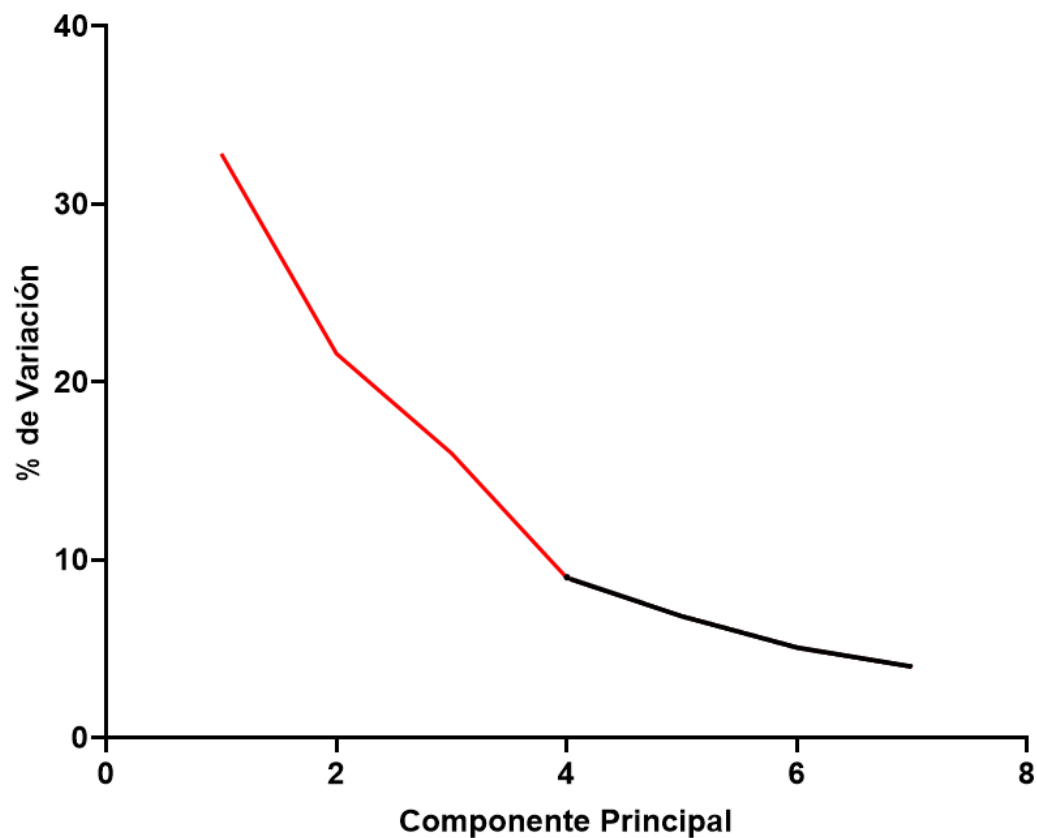


Fig. 8 Método del codo para elección de PC, se identifica visualmente el punto (indicado de color negro) en donde se produce una caída significativa en la variación

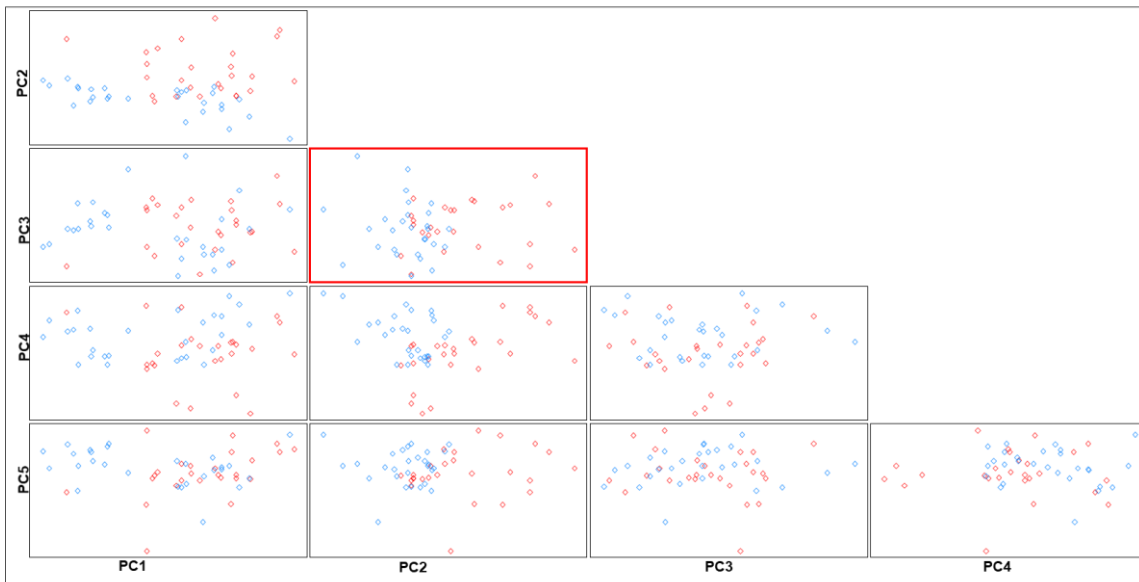


Fig. 9 Scores de cada componente principal, según altitud. El PC seleccionado se indica con color rojo.

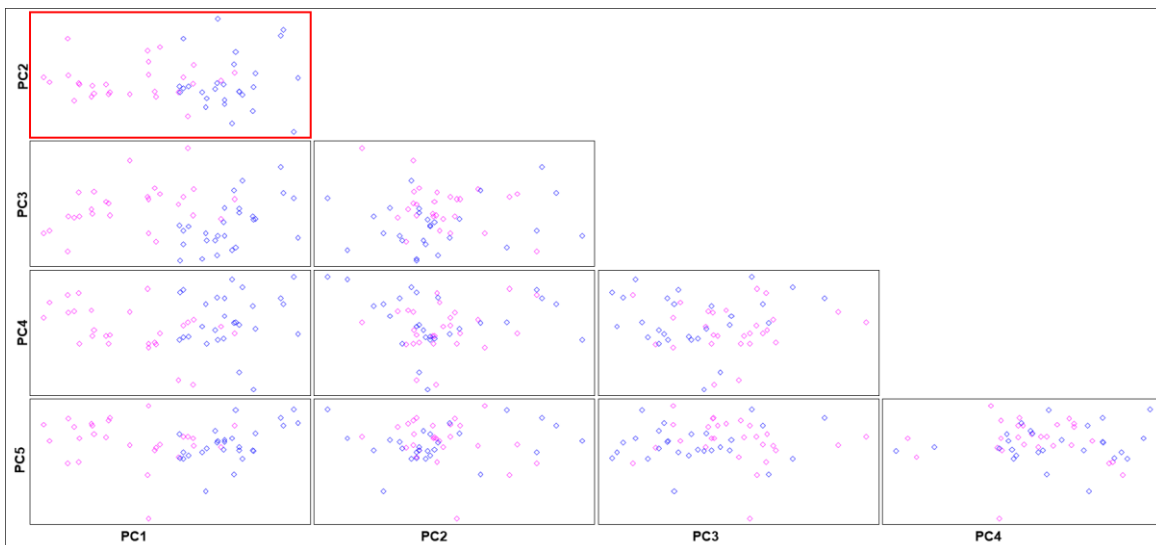


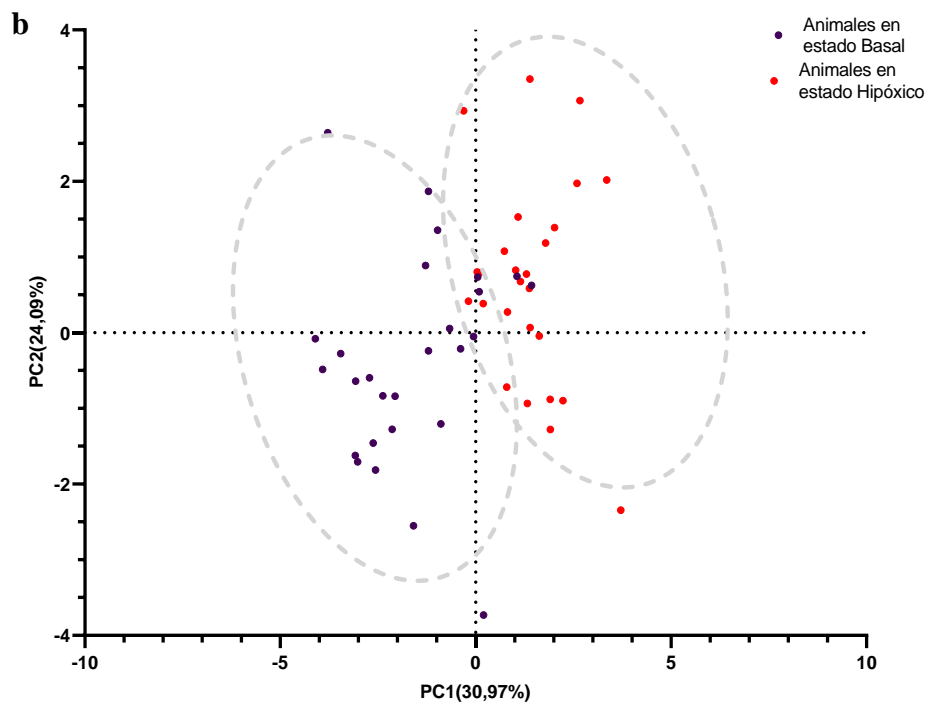
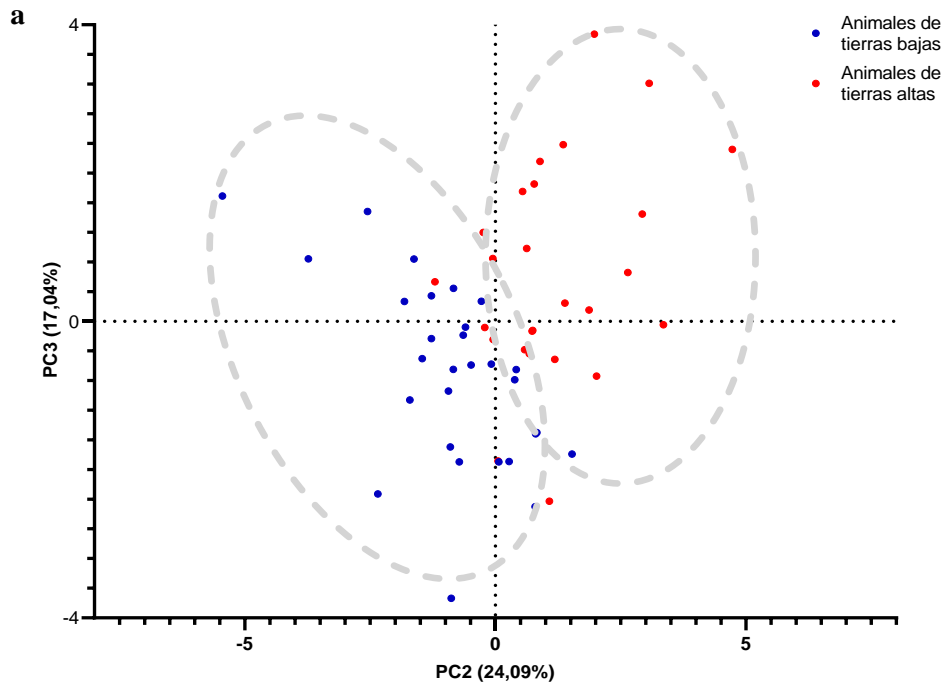
Fig. 10 Scores de cada componente principal según condición de oxigenación. El PC seleccionado se indica con color rojo.

Como observamos en la figura 11a, PC2, describió el 24,09% de variación y agrupó los individuos según la altitud. Se observa en la Fig.11a, la distribución para el grupo de animales de tierras altas, la elipse punteada agregada de manera arbitraria que rodea a cada grupo (puntos de color rojo), indica la agrupación de estos individuos,

y se observa que están hacia la derecha de la abscisa y el siguiente grupo de individuos rodeados por la elipse segmentada indica la agrupación de individuos de tierras bajas (puntos de color azul) y están situados al lado izquierdo de la abscisa (Fig. 11a).

La segunda distribución agrupó a los individuos según sea la condición, ya sea en estado basal (normoxia) o estado de hipoxia donde el PC1 describe el 30,97% de variación (Fig.11b). Se observa en la Fig.11b la distribución de los ovinos, y su agrupación como lo muestra la elipse con líneas discontinuas creada de manera arbitraria, que rodea a aquellos individuos que están en estados de hipoxia (puntos de color rojo) y se distribuyen en el lado derecho del eje x y los que están en estado basal también encerrados por un ovalo discontinuo (puntos de color morado) se ubican al lado izquierdo del eje x.

La tercera distribución indicó la separación de 4 grupos de acuerdo con sus similitudes, en esta última agrupación se describe un PC1 con un 30,97% de variación. Se observaron (Fig.11c) elipses con líneas discontinuas formadas de manera arbitraria, rodeando a grupos que están representados por puntos de color. Se observan aquellos puntos de color morado y nos indican la distribución de aquellos individuos de tierras bajas en estado basal (TBB), en los puntos de color rojo, individuos de tierras altas en estado basal (TAB), en color verde aquellos de tierras bajas en estado de hipoxia (TBH) y de color amarillo aquellos de tierras altas en estado hipóxico (TAH).



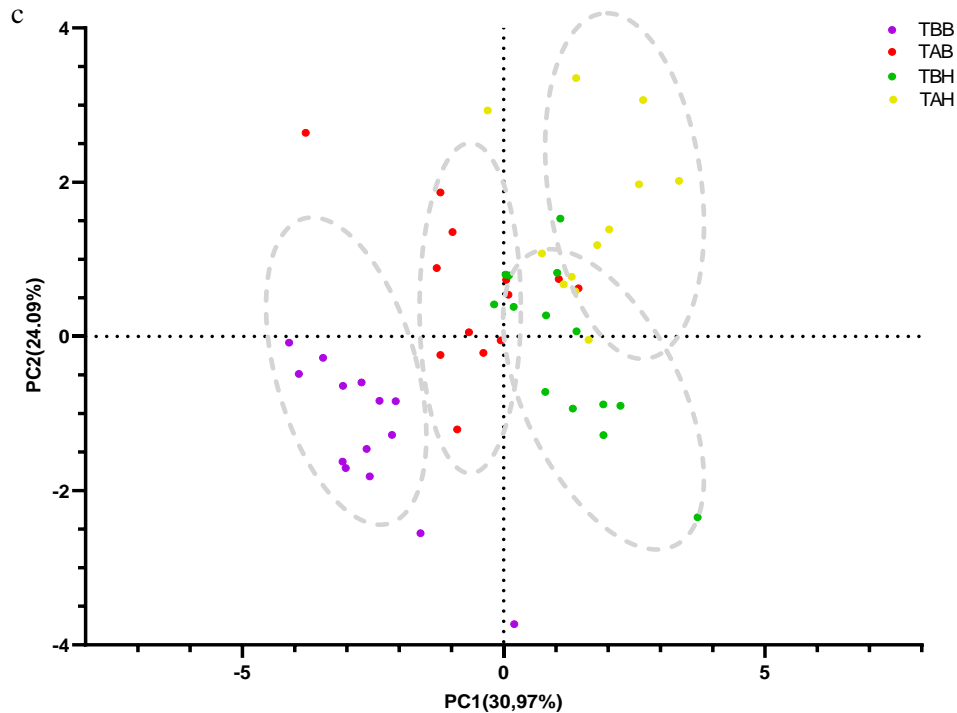
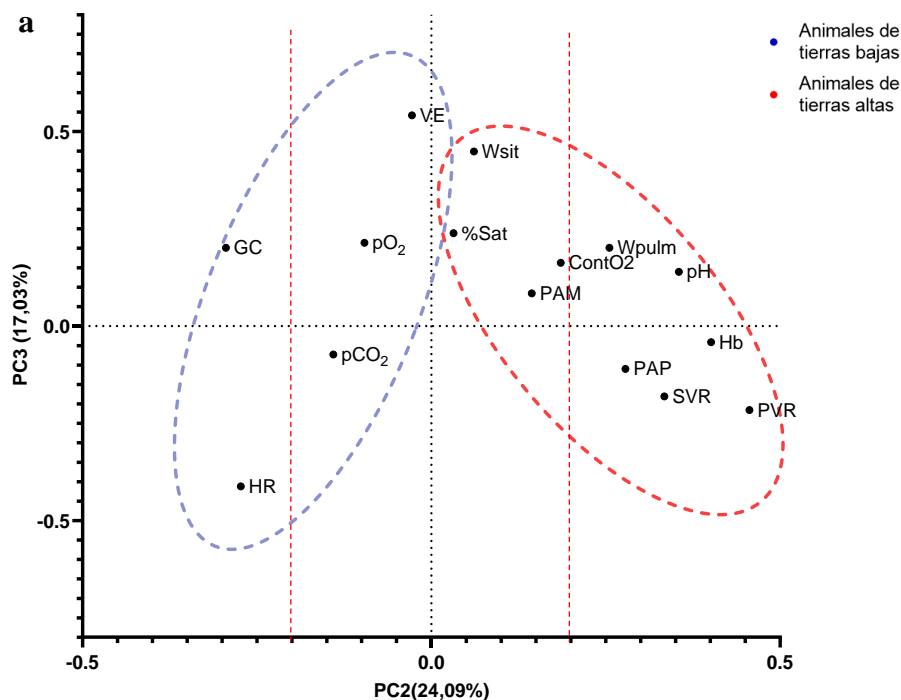


Fig.11 Gráfico de PCA, presentando los Scores de ovinos recién nacidos en tierras altas y tierras bajas de ambas condiciones de oxigenación (a) y ovinos recién nacidos de ambos grupos en estados condiciones basal e hipoxia (b) ovejas recién nacidas en tierras bajas-basal (TBB), tierras altas-basal (TAB), tierras bajas-hipoxia (TBH) y tierras altas-hipoxia (TAH) (c). Las elipses y los puntos de colores muestran la agrupación de las muestras, entre paréntesis de expresa el porcentaje de variación de los PC.

Principales variables clínicas que permiten clasificar la HPPN

Para identificar las variables que podrían ayudar a modelar la Hipertensión pulmonar Persistente en el Recién Nacido, generamos el gráfico de *loadings* (Fig. 12a y b). Para resaltar esto, las Figuras 12 a y b, muestra una clasificación de variables por importancia. Las variables con valores de carga positivas están directamente correlacionadas con animales de tierras altas y en estado de hipoxia, ya que estos también se ubican en el lado positivo de PC1 y PC2 en los *loadings*. Las variables con valores de carga negativos tienen una correlación con los animales de tierras bajas y en estado de basal.

Las elipses con líneas segmentadas indican aquellas variables que están involucradas en ambas altitudes y estados de oxigenación. En tierras bajas, la elipse de color azul encierra a aquellas variables que pesan más y la elipse de color rojo aquellas variables que tiene mayor peso en tierras altas (Fig.12a), a su vez se pueden observar las variables implicadas en los estados de oxigenación, indicadas por las elipses de color morado en estado hipóxico y rojo en estado basal (Fig.12 b). Después de aplicar un límite de carga arbitrario de $|0,20|$ a simplificar la interpretación de la estructura factorial, podemos observar que la distribución por altitud las variables de más peso son GC, HR, Wpulm, pH, PAP, Hb, SVR y PVR. Mientras que las variables que tienen más peso en la distribución por condición son SVR, ContO₂, %SAT, pO₂, PAP, Wpulm, PAM y GC.



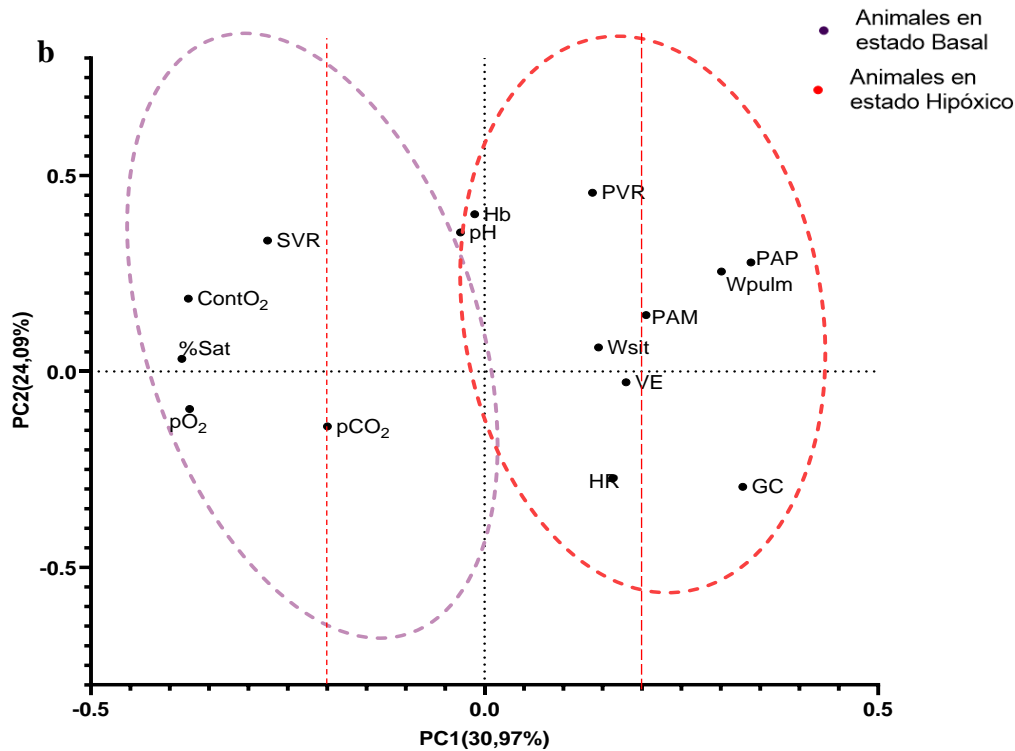


Fig.12 Gráfico de PCA, presentando loadings de ovinos recién nacidos en tierras bajas y tierras altas (a) y estado basal e hipóxico (b). Las elipses de colores muestran la agrupación de las muestras. Entre paréntesis, de expresa el porcentaje de variación de los PC. La línea roja segmentada indica el punto [0,2]

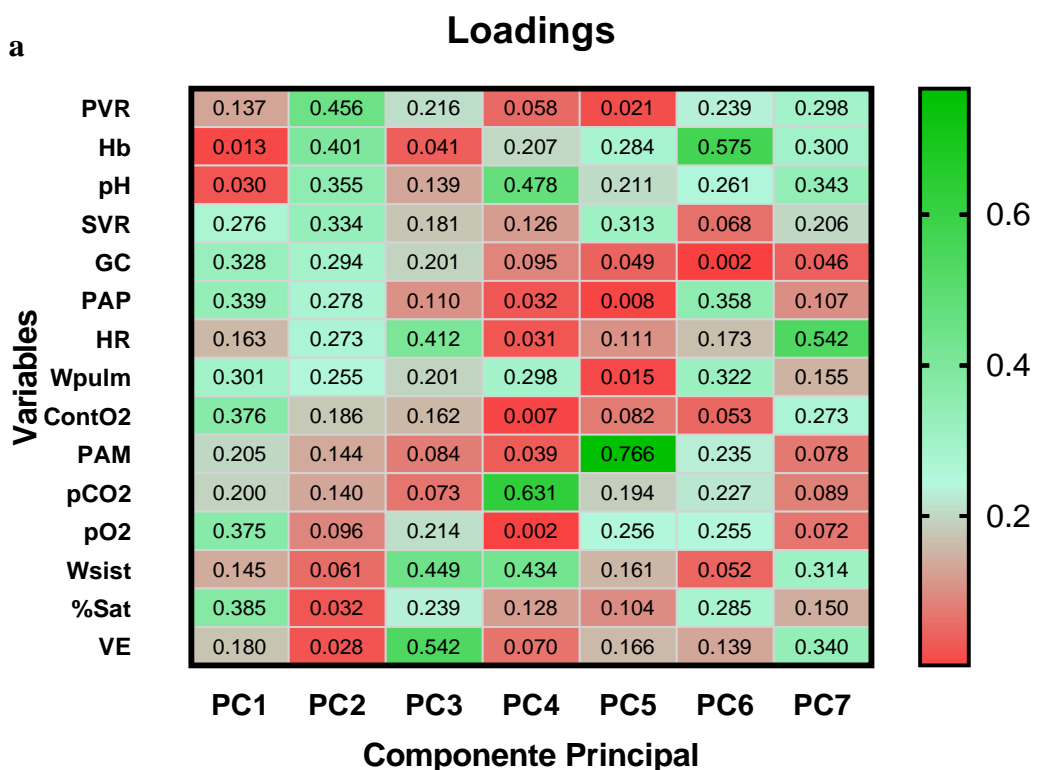
Mapa de calor de Loading de Variables Cardiopulmonares en cada

Componente Principal

Se elaboró un mapa de calor de *loadings* para cada Componente Principal, para visualizar de manera más didáctica y clara el peso que tenía cada variable en cada componente, según grupos de altitud y condición de oxigenación (hipoxia- basal) (**Figura 13**). Las variables se observaron en lado derecho de los gráficos, mientras que en el lado izquierdo se visualizaron la escala con valores de *loadings* de cada variable, los colores indican puntajes, para el grupo de altitud, el rojo, celeste y verde (Fig. 13a) y para el grupo de condición de oxigenación, verde, rosado y fucsia

(Fig.13b). La graduación de los colores indica la variación de la escala, desde el [0,2 al 0,6], aquellos que tienen color verde son los que tienen mayor peso en el grupo de altitud y los que tienen un color fucsia, son aquellos que tienen mayor peso en condición de oxigenación, los números en cada mapa indica el *loadings* de cada variable.

En esta investigación, es PC2 aquel que genera una mejor agrupación de los individuos, en altitud y PC1 el que mejor aglomeró y además tiene mejor porcentaje de variación, por lo tanto, de acuerdo con esto, se observó cuales variables tienen mayor puntaje.



b

Loadings

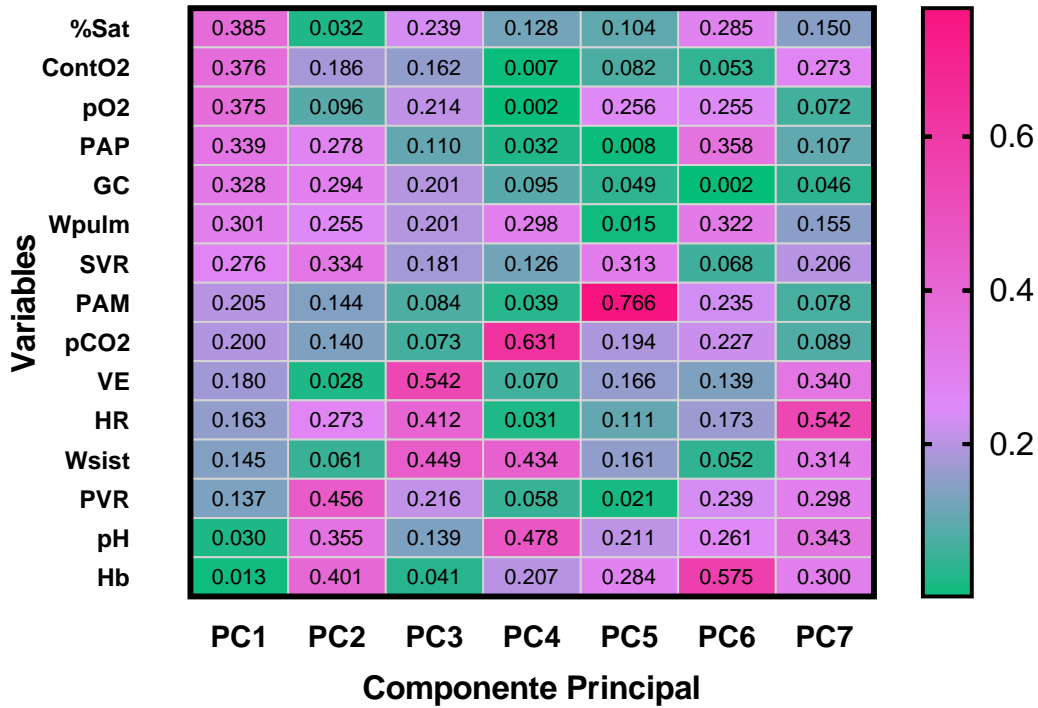


Fig.13. Mapa de calor, presentando loadings de cada variable cardiopulmonar en cada Componente Principal, (números) en los grupos de (a) altitud y (b) condición. A la derecha se encuentran las variables y a la izquierda se muestran la escala de puntajes. Color verde mayor puntaje, color rojo menor puntaje (a), color verde menor puntaje, color fucsia mayor puntaje (b)

Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

Una vez definidas aquellas variables de importancia en las condiciones observadas, se utilizó una aproximación supervisada con el objeto de optimizar y obtener medidas de confianza con respecto a el efecto de las distintas variables medidas en la estimación de hipertensión pulmonar. Utilizando PLS se dispusieron los valores de PAP como nueva variable dependiente (excluyendo aquellas variables que depende de su valor para su cálculo como trabajo y resistencia pulmonares), con

ello se determinó la relación directa de cada variable medida con respecto a la variable dependiente. Este método toma los diferentes vectores de cada Componente Principal e intenta ajustarlo a la mejor ecuación lineal, que ajuste todas las variables de todos los animales en todos los tratamientos.

Se puede observar en los gráficos las relaciones que hay entre la Presión Arterial Pulmonar ubicada en el eje x, versus sus valores predictivos situados en el eje y, y la mejor ecuación entre los valores predichos y reales mediante la fórmula de regresión lineal $y=mx+n$.

Los grupos analizados fueron divididos según la altitud, aquellos gestados en tierras altas y los de tierras bajas, además dentro de cada grupo se clasificaron con su condición de oxigenación, quiere decir estado basal e hipoxia. En la Figura 14, a y b, se observan puntos de colores, que indican la agrupación de aquellos individuos de estado normóxico, representado con color verde y el grupo de individuos que fue expuesto a hipoxia, representado con el color azul.

Además de obtener los valores de la regresión un valor importante es la bondad de ajuste de la recta (r^2), la cual describe lo bien que se ajusta un conjunto de observaciones. Las medidas de bondad en general resumen la discrepancia entre los valores observados y los valores esperados en el modelo de estudio. Los valores de r^2 observados tienen un valor de 0,78 (78%) para tierras bajas (Fig.14a) y un r^2 0,79 (79%) para tierras altas (Fig.14b). El análisis de ambas rectas nos muestra los valores de p, $<0,005$ y un r^2 superior a 0,75, indicándonos una buena correlación entre las variables y la predicción de PAP.

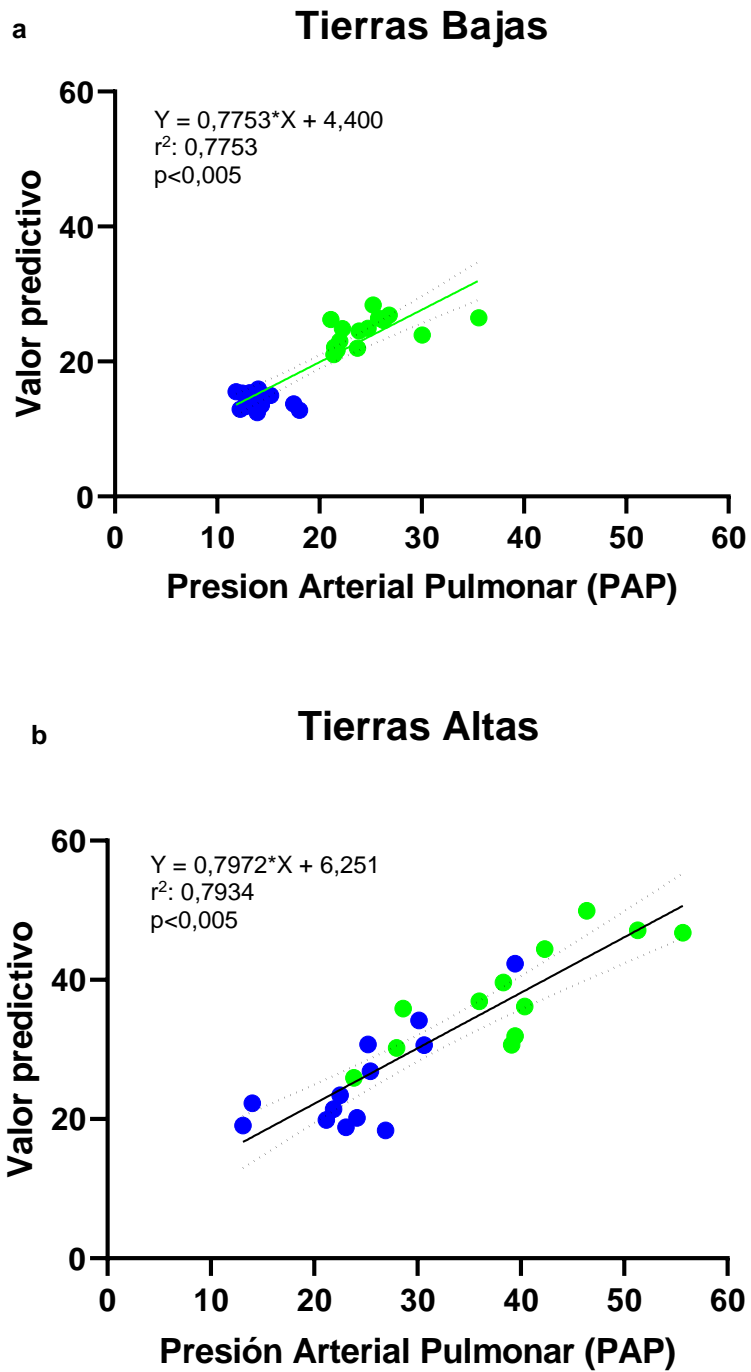


Fig.14 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), se presenta la relación entre la PAP versus su valor predictivo, en ambas altitudes, tierras bajas (a) y tierras altas (b). Los colores representan la condición, el azul para el estado basal y el verde para el estado hipoxia.

La Tablas 2 muestran el análisis en detalle del Vector resultante del análisis PLS para cada condición de altura de manera diferencial., en ella se grafican el *loading* (peso) de cada variable y su correlación con la ecuación resultante. En azul se destacan variables con buen *loading* y buena correlación, en rojo las variables con mal *loading* y mala correlación y en blanco aquellos con valores asimétricos.

Tabla 2. Parámetros Vector Regresión y Correlación

Variable	Tierras Bajas		Tierras Altas	
	Vector de Regresión	Correlación	Vector de Regresión	Correlación
PAM	-0,031377	0,034609	0,058233	0,460455
HR	0,234127	0,74022	-0,316977	0,158045
GC	-0,005986	0,292023	-0,130295	0,257671
SVR	-0,094721	-0,51854	0,059586	-0,055707
pH	-0,029236	-0,301599	0,622437	0,219888
pCO₂	0,042631	0,052277	0,554577	-0,217616
pO₂	-0,263243	-0,860543	-0,72949	-0,639134
%Sat	-0,218968	-0,810262	-0,282574	-0,462659
ContO₂	-0,189274	-0,738585	-0,260975	-0,492125
Hb	0,059551	0,062307	-0,746722	0,107901
VE	-0,088702	0,012729	0,135838	0,081475
Wsist	-0,091912	0,018457	0,097927	0,183081

Tomando en consideración solo las variables importantes en cada altura (color azul), se realizó un nuevo análisis vectorial fusionando ambas bases de datos al unisonó, generándose la siguiente ecuación general mediante PLS que predice PAP a partir de las otras variables medidas:

$$PAP = (pH * 0,44) + (pCO_2 * 0,04) - (pO_2 * 0,32) - (\%sat * 0,22) - (Cont O_2 * 0,25) + (Hb * 0,05)$$

Al comparar los valores predichos por la ecuación con los valores reales de PAP, se obtienen las siguientes características como algoritmo predictor:

- **Bondad de Ajuste (r^2) = 0,72**
- **Sensibilidad = 97,4%**
- **Especificidad= 88,2 %**
- **Exactitud = 94,6%**
- **Tasa de Error: 5,4%**
- **RV + = 8,28**
- **RV- = 0,03**

DISCUSIÓN Y/O CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio apoyan nuestra hipótesis, ya que permiten apreciar que el enfoque actual para diagnosticar la Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido, el cual se basa en analizar solo tres variables las cuales son PAP, GC y pO₂, indicadas en la guía de MINSAL⁵⁰, posee debilidades ya que no toma en consideración otras variables cardiopulmonares de importancia que de acuerdo con nuestra investigación podrían enriquecer y mejorar la evaluación clínica de la patología antes señalada.

De acuerdo con estudios realizados en Chile, se indica que el porcentaje de HPPN está subdimensionado, y esto es debido a que muchos de los recién nacidos con problemas respiratorios son diagnosticados con el síndrome de distrés respiratorio (SDR)⁵¹, y este tiene causalidad variada, como la Enfermedad de Membrana Hialina (EMH), Bronconeumonía (BNM), Síndrome Aspirativo Meconial (SAM) y Taquipnea Transitoria (TT), Hernia Diafrágica Congénita (HDC), Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP) y entre otros trastornos⁵². En relación con lo señalado anteriormente, resulta importante mencionar que no existen datos actuales con respecto a la prevalencia del SDR en Chile, ni del porcentaje atribuible a cada etiología⁵¹, ni estudios en los que se caracterice a los RN y sus madres según caracterización sociodemográfica propia del país. A continuación, se discutirán los resultados más relevantes obtenidos en esta tesis.

A raíz de la problemática planteada es que surge la necesidad de precisar el diagnóstico de HPPN, por lo que la utilización de la herramienta *Machine Learning*

surge como una oportunidad de optimizar los criterios a la hora de diagnosticar, además es una metodología que nos permite contar con otra alternativa para determinar PAP, y con ello no depender del cateterismo derecho el cual es altamente invasivo para el neonato.

Variables Cardiopulmonares

La exposición perinatal a hipoxia crónica induce cambios que demuestran adaptaciones o aclimataciones de las respuestas cardiopulmonares a una menor biodisponibilidad de oxígeno. Al observar las diferencias significativas entre las variables tanto cardíacas como pulmonares, producto de la gestación sometida a hipoxia crónica. Estas diferencias se explican debido a que, en estado basal, los niveles de Presión Parcial de Oxígeno (pO_2), son normales, situándose entre 80-100 mmHg⁵³, por lo que en consecuencia, un recién nacido a esa altura tendrá el nivel de oxígeno necesario para que sucedan los cambios estructurales y funcionales en el sistema respiratorio con el objetivo de un desarrollo adecuado, sin embargo, a una altitud mayor los niveles de pO_2 , disminuyen alrededor de 40 mmHg, esto conlleva a una mala adaptación del sistema cardio-respiratorio en un recién nacido, y una de las consecuencias es la HPPN ⁵⁴. Las diferencias significativas observadas en el episodio de hipóxico agudo sobreagregado, en individuos de tierras bajas y tierras altas se explican debido a que se produce una vasoconstricción pulmonar, que, en este estado de oxigenación, sin embargo, esta

respuesta se ve aumentada en los recién nacidos que fueron gestados en hipoxia crónica¹³.

Al comparar los grupos de altitud, encontramos diferencias significativas en la condición basal, esto es consecuencia de la baja disponibilidad de oxígeno induce un cambio en los patrones de expresión de ciertas proteínas o enzimas, que induce la liberación de hormonas o moléculas que actúan de manera paracrina, y que provocan la respuesta diferencial. En altura y dada la menor cantidad de oxígeno hay una vasoconstricción basal, que está apoyada por la expresión y función de mecanismos vasoreguladores, disminución de vasodilatadores, moléculas antiproliferativas, y aumento de moléculas vasoconstrictoras y moléculas que inducen proliferación, estrés oxidativo e inflamación^{12,6}. Estos cambios observados, eran esperables ya que según la literatura⁵⁵, nos indica cómo reacciona el sistema respiratorio a cambios de presión parcial de O₂, y es así que estos resultados apoyan nuestro modelo experimental

Análisis de Agrupamiento Jerárquico (HCA) por individuos.

Para contextualizar la discusión mencionaremos que al trabajar con HCA, logramos identificar las similitudes y las diferencias⁵⁶ que existen en animales cuyo origen se remite a tierras bajas, quienes, para efectos de este estudio, y tal como se propone en una investigación previa, representan a individuos sanos¹³, mientras que los de ovinos gestados en altura, representa a los individuos con Hipertensión Pulmonar

Persistente en el Recién Nacido. Esto con el fin de reconocer que criterios son necesarios de incorporar un diagnóstico más exacto de la HPPN.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, logramos identificar la relación que existe entre individuos expuestos a diferentes altitudes, aspecto que refuerza lo planteado en un estudio, que formulan que existe una diferencia en la respuesta cardiovascular en aquellos individuos expuestos a condiciones basales e hipoxia¹³. Esto, toda vez, que al evaluar los resultados realizados mediante HCA, podemos observar la formación de diferentes grupos claramente definidos, por altitud y condición de oxigenación, estos se visualizan en los dendrogramas (Fig. 4, 5, 6 y 7).

A continuación, en la Fig. 4, encontramos que, en un mismo grupo de individuos gestados y nacidos en tierras bajas, hay diferencias que los separan, aspecto que no ha sido considerado en otras investigaciones y que se presenta como una variable que sustenta la elección HCA para la detección del HPPN. Esto se ejemplifica cuando encontramos semejanzas, en el porcentaje de Saturación de Oxígeno (%Sat) y la Presión Parcial de O₂, ambos son mayores que en el grupo 2, también se observa que en este último el Trabajo Pulmonar (Wpulm) es menor y tienen un Gasto Cardíaco (GC) mayor. El grupo de individuos de Tierras Altas, son clasificados en dos grupos también (Fig.4 color fucsia y azul) esta división del grupo es consecuencia de las diferencias de los valores en variables como la PAP, Trabajo Sistémico (Wsist) y %Sat, estos tienen resultados más elevados que en el grupo 4.

La literatura reporta que hay investigaciones relacionadas con HCA e HPPN, sin embargo, evalúan otras variables clínicas como es edad, etnia, etiología de la

enfermedad, y por lo demás, se evalúan pacientes adultos⁵⁷. También hay otros estudios que identifican la metodología para la predicción de la Hipertensión Pulmonar⁵⁸, no obstante, incorporan en la evaluación diagnóstica únicamente las variables que presenta la ecocardiografía.

De acuerdo con lo anterior, hasta el momento, las investigaciones realizadas mediante *Machine Learning* e Hipertensión Pulmonar, son realizadas en pacientes adultos, evaluando parámetros limitados, para formular un diagnóstico de la HPPN, quedando postergada la investigación en la población de recién nacidos. Por lo que nuestro estudio proporcionaría una nueva metodología que puede aportar en el diagnóstico de dicha patología.

Existe evidencia que indica que los individuos de tierras bajas en condición de oxigenación basal e hipoxia presentan valores en las variables cardiopulmonares distintas, a los individuos de tierras altas⁵⁵. Esto confirma lo planteado y refuerza lo que se aprecia en el siguiente dendrograma (Fig.5), el que nos presenta 3 agrupaciones, al examinar primero, nos percatamos que no es homogéneo ya que se encuentra formado por ovinos recién nacidos en tierras bajas en condición de hipoxia y condición basal, además de algunos individuos de tierras altas en estado basal e hipoxia, este agrupamiento es consecuencia de los valores del gasto cardiaco, trabajo sistémico ya que se encuentra aumentado, como lo que se observa en tierras bajas en estado de hipoxia. Los otros dos que son diferentes corresponden a individuos de tierras altas basal e hipoxia, se aglomeran aquí debido a que el Volumen Expulsivo y Trabajo Pulmonar, son similares a los de tierras bajas hipoxia, y el individuo de tierras altas hipoxia, tienen un Porcentaje de Saturación

de Hemoglobina más bajo en comparación a los individuos que componen el grupo de tierras altas hipoxia, es más similar al grupo de tierras bajas basal. El segundo grupo se agrupan en un 99% individuos de altura, solo uno de ellos es de tierras bajas hipoxia, sin embargo, en este grupo se observan 12 individuos de tierras altas en estado basal y 12 individuos de tierras altas en estado de hipoxia, la explicación a esta situación se debe a que el individuo que es tierras bajas hipoxia se agrupa aquí debido a su Porcentaje de Saturación de Hemoglobina es muy similar a este grupo que al conjunto de tierras bajas hipoxia.

La explicación de la agrupación de todos los ovinos de tierras altas juntos es en consecuencia a los valores de las variables, la PAM es similar en ambos grupos y el Gasto Cardíaco⁵⁹, en cambio en tierras bajas se divide por condición de oxigenación debido a las diferencias que existen entre sus variables cuando un individuo está en estado basal y cuando está expuesto a hipoxia, coincidiendo con lo planteado en la literatura⁵⁵. El último grupo es 100% homogéneo, debido a que las variables están en rangos aceptados, de acuerdo con los criterios diagnósticos establecidos por el MINSAL⁵⁰. Finalmente, se observan que se agrupan también de acuerdo con los promedios similares que tienen entre sus variables, como la PAP, GC, %Sat de Oxígeno, incluso los individuos de tierras bajas basal tienen la PAP más baja⁵³, en término medio los individuos de tierras bajas hipoxia y finalmente la PAP más altas los individuos de tierras altas.

Análisis de Agrupamiento Jerárquico, por Altitud

Tal como lo plantea la literatura, para un correcto desarrollo del sistema respiratorio de un individuo necesita ciertas condiciones como lo son, un equilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores, estos últimos dependen de una alta presión parcial de oxígeno⁶⁰. Por lo tanto, las alteraciones en de estas condiciones pueden tener como consecuencia el desarrollo de la HPPN. Estudios previos indican la relación que existen entre algunas variables⁵⁹. No obstante, no han realizada un HCA, ni tampoco una comparación entre grupos por altitud.

Nuestro estudio realiza una comparación entre grupos de tierras bajas y altas (Fig. 6 y 7) y muestra cómo se agrupan las variables de acuerdo con los niveles de pO_2 que presenten. El primer grupo del HCA de tierras bajas (Fig.6), muestra variables cardiacas como VE, GC, también trabajos pulmonares y PAM, esto se explica debido a que el volumen expulsivo depende del gasto cardiaco para ser determinado, en este caso en tierras bajas ambos se encuentran en rangos normales (VE = 60-70 mL/latido, GC= 5L/min), lo que es respaldado también en la investigación⁶¹. Tanto el trabajo pulmonar, como el trabajo sistémico, dependen del gasto cardiaco, lo que se condice con el estudio¹³, es por esta razón que se agrupan, y finalmente el trabajo sistémico además de depender del VE depende de la PAM⁶¹de esta forma, todas estas variables se encuentran relacionadas.

En el segundo grupo (Fig. 6, color celeste) se analiza el pH, gases en sangre y variables pulmonares, por lo que trabajaremos con Hb, pCO_2 , PVR, PAP, HR. De acuerdo con la literatura, podemos observar que su agrupación se da por

consecuencia de la hemoglobina⁶² lo que guarda directa relación con lo planteado por esta investigación, ya que interactúa con pCO_2 , esta dependencia se basa en que si aumenta de la concentración de CO_2 disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y produce un desplazamiento de la curva de saturación de la hemoglobina hacia la derecha⁶². Con respecto al GC, PVR y PAP, si aumenta PVR aumentará el gasto cardiaco, ya que, la RVP al estar aumentada, se incrementará también el gasto cardíaco, obtenido como resultados elevaciones significativas de la PAP. En el último grupo se observan $ContO_2$, %Sat, pO_2 , SVR y pH, tal como se explicó anteriormente hay relación entre estas variables el paso de Oxígeno desde el alvéolo a la Sangre está relacionado con la presión parcial del Oxígeno, con lo que una disminución de esta disminuye el paso de Oxígeno a la Sangre⁶², y con una menor altura, se produce la hiperventilación aumentando el pH⁶³.

El segundo análisis de agrupamiento jerárquico (Fig. 7) nos muestra la agrupación de las variables de los individuos de altura, donde se aprecian 3 grupos. El primero nos presenta trabajos pulmonares, PVR, PAP y PAM. En relación con lo planteado en la literatura⁵⁵ esto se justifica mediante la relación que existe entre ellos. En este caso la PAP está directamente relacionada con el trabajo pulmonar¹³ por lo tanto en tierras altas, ambos se ven aumentados, lo mismo sucede con la PAM, que, a partir de esta, podemos determinar el trabajo sistémico, por lo que se constata que ambos están aumentados. A su vez, cuando analizamos la PVR, observamos que en tierras altas está alterada⁵⁴, presentándose de manera aumentada en tierras altas, producto de esto, las arterias pulmonares presentan menor lumen y mayor engrosamiento.

El segundo grupo se compone de VE, GC y HR, de acuerdo con ello, estas variables presentan valores alterados en condiciones de hipoxia^{54,64}. A su vez, el volumen expulsivo depende del gasto cardiaco y la frecuencia cardiaca, ya que es determinado a partir de estas, lo que genera que, en estado de hipoxia, estos estén aumentados. No obstante, hay una alta resistencia vascular sistémica, por lo que el volumen de precarga que determina el VE⁶⁵, se ve disminuido, sin embargo, también varía de acuerdo con el peso y la edad de los ovinos.

Finalmente podemos ver en el último grupo Hb, pCO₂, SVR, Cont O₂, %Sat, pO₂ y pH. al analizar esta relación se concluye que, al aumentar la altura, la presión parcial de oxígeno disminuye, lo que conlleva a una disminución en el porcentaje de saturación de hemoglobina, reafirmando lo evidenciado en la literatura⁵³. Esto además repercute en una hiperventilación, reduciendo la presión parcial de CO₂, lo que finalmente produce una alcalosis respiratoria, justificando que el pH también esté involucrado.

Por último, el paso de Oxígeno del alvéolo a la Sangre está ligado a la presión parcial del Oxígeno, con lo que una disminución de la Presión Atmosférica trae consigo una disminución de la presión parcial de Oxígeno, y esto, a su vez, disminuye el paso de Oxígeno a la Sangre⁶⁶.

Al contrastar los dendrogramas de tierras bajas (Fig.6), con el de tierras altas (Fig.7), podemos concluir que la agrupación de las variables difiere en ambos casos de manera significativa, producto de las condiciones de oxigenación, lo que indica que a mayor altitud los valores de las variables se pueden observar alterados.

Nuestro estudio se basa en 15 variables cardiopulmonares, sin embargo, a diferencia de otras investigaciones⁵⁸, por el momento no se pueden realizar un análisis por sexo, debido a que en tierras altas hay mayor cantidad de machos, por lo que no se podría realizar una conclusión consistente en base a esta variable, por lo que de momento no es considerada.

Debido a lo anterior nuestro estudio aporta evidencia que hay más variables que se debiese tomar en consideración al momento de evaluar la HPPN, ya que podrían estar influyendo de manera importa a esta.

Análisis de Componentes Principales

Al observar los resultados obtenidos a partir del análisis de componente principales, se aprecia una distribución de individuos y variables de acuerdo con la altitud (Fig.11a) y a su condición (Fig.11b), formando grupos espontáneos. En primera instancia estas agrupaciones se generan en base a los componentes principales, según la bibliografía estos son elegidos de acuerdo con el porcentaje de variación, indicados en el gráfico del método del codo (Fig.8) y a la adecuada formación de grupos. De acuerdo con esto se toma la decisión de la elección del componente principal⁴⁹.

A partir de esto se crean gráficos de *score* y *loading*, el primero presenta la formación de grupos de acuerdo con sus similitudes y diferencias, mientras que los segundos indican la carga o peso que tienen las variables en el componente principal, tal como lo indican estudios previos⁴⁸. Por lo tanto, al analizar los datos,

por medio del gráfico de *score*, se obtiene que el mejor PC, a la hora de agrupar los datos por altitud fue PC2, mientras que PC1 forma una excelente agrupación por condición de oxigenación hipóxica. En ambos casos se observan grupos claramente definidos con alta variación como recomienda la literatura ⁴⁸.

Al analizar los resultados nos percatamos que al agrupar a los individuos por altitud (PC2) Fig. 11a, se observa claramente que el grupo de tierras bajas está distribuidos a la izquierda del eje x, lo que ocurre de manera similar en el grupo de tierras altas, agrupados a la derecha del eje x. El gráfico que muestra la distribución según condición de oxigenación (PC1), Fig. 11b agrupa de acuerdo con las similitudes que hay entre los valores de las variables, en la condición basal tienen rangos normales a diferencia de aquellos individuos que se encuentran en estado de hipoxia, en esa situación se observan valores alterados.

Posteriormente al analizar los gráficos de *loadings* realizado por altura (Fig. 12a), podemos observar que las variables que influyen de manera directamente proporcional es decir que a mayor valor de la variable existirá una mayor posibilidad de pertenecer al grupo de elevada altitud, son *Wsist*, %Sat, PAM, ContO₂, *Wpulm*, pH, PAP, SVR, Hb, PVR mientras que las que presentan un menor valor, la probabilidad que el animal sea parte del grupo de elevada altitud será menor, en este caso las variables son: VE, pO₂, pCO₂, HR y GC. De esta distribución de variables debemos destacar *Wpulm*, pH, PAP, Hb, SVR y PVR, las cuales presentan un valor mayor a 0,2, lo que se indica en la literatura como adecuado. Este resultado apoya nuestra hipótesis ya que para diagnosticar la HAP según la guía del MINSAL son consideradas solo tres variables (PAP, GC y pO₂) que se determinan al

momento de la evaluación del paciente. Además de esto se considerará para el diagnóstico, que los valores de PAPm sean sobre los 20mmHg⁶⁷. No obstante, sin desmedro de lo anterior, este estudio relaciona más variables para mejorar la clasificación y obtener un diagnóstico adecuado de la HAP.

Si bien, en general en clínica se prefiere la distribución del modelo animal según altura, de igual forma quisimos ver que ocurría cuando los separábamos por condición de oxigenación. Es así que aquí podemos observar que PVR, PAP, PAM, Wsist, Wpulm, VE, HR, GC y Hb son aquellas variables que, al tener mayor valor, tienen mayor posibilidad de pertenecer al grupo de estado hipóxico, indicándonos este resultado, que tiene una relación directamente proporcional, mientras que Cont O₂, SVR, %Sat, pO₂, pCO₂, y pH al tener menor valor, tienen menor probabilidad de pertenecer a este grupo. De la distribución de las variables que pertenecen al grupo hipóxico podemos destacar PAM, Wpulm, PAP y GC, ya que son aquellas que presenten valores de *loadings* mayores a 0.2.

A continuación, se analizarán las variables que, según nuestro modelo, deben estar presentes a la hora de diagnosticar la hipertensión pulmonar persistente en el neonato. En primera instancia se observa que los trabajos pulmonares son variables que influyen en la HAP, y son determinados, tanto por la presión específica del lecho capilar, como por el volumen expulsivo, por consiguiente, en la HAP, en la PAP y en la PAM están aumentadas^{13,63} para poder regular el flujo sanguíneo, mientras que el VE, está disminuido, y tal como lo indica la bibliografía^{13,68}, ambos trabajos respiratorios (pulmonar y sistémico) se verán aumentados debido a este proceso.

El pH también parece estar relacionado con el desarrollo de HAP ya que a mayor altitud existe una menor pO_2 , lo que a su vez producirá hipoxia, generando de manera paralela una respuesta de hiperventilación, lo que se encuentra en concordancias con investigaciones previas⁶¹. Esta respiración rápida y profunda causa alcalosis sanguínea respiratoria esto significa que hay una tendencia a la elevación del pH arterial, en situaciones de hiperventilación alveolar el $pH > 7.45$ y la $pCO_2 < 28$ mmHg⁶³. Esto en concordancia con estudios previos que muestran que la alcalosis provoca vasoconstricción debido al incremento de la entrada de Ca^{2+} en las células, en consecuencia, provoca un aumento de la PAP. A raíz de lo señalado es que concluimos que el pH influye en el tono vascular⁶⁹.

En respuesta a la hipoxia hipobárica, la circulación pulmonar genera una importante vasoconstricción que resulta en hipertensión pulmonar, a su vez, a largo plazo, genera remodelamiento de los vasos pulmonares, reduciendo aún más el lumen vascular, además de aumentar la resistencia vascular pulmonar (RVP)⁶¹. De igual manera la hipoxia aguda también aumenta la PAP, PVR, con la frecuencia cardíaca (HR), en tierras altas y bajas en comparación con su período basal, esto se explica por los diferentes niveles de pO_2 , en cada grupo¹³.

Además, los ovinos recién nacidos, tenían un aumento en la concentración de Hb a gran altura. Esto se explica debido a la estimulación hipóxica, que provoca secreción de eritropoyetina⁶⁴ en las tierras altas, hormona cuya función es estimular a la médula ósea para la producción de glóbulos rojos, esto también justificaría la alta concentración de hemoglobina.

La resistencia vascular sistémica, hace referencia a la resistencia que ofrece el sistema vascular al flujo de sangre, en el caso de la HP esta disminuida, debido a que la hipoxia provoca una menor activación de los factores vasodilatadores periféricos como óxido nítrico, el factor hiperpolarizante endotelial y/o prostaciclina⁶¹. A continuación, se observa que basalmente los corderos recién nacidos a altura presentan un aumento proporcional en el gasto cardiaco, esto se debe a la tensión que ejerce la columna de sangre sobre la superficie endotelial (estrés tangencial)⁶⁴.

Finalmente podemos precisar que a mayor altitud disminuye el porcentaje de saturación de la hemoglobina⁵³, sin embargo, a medida que pasa el tiempo, la alcalosis respiratoria produce una compensación moviendo la curva de saturación de hemoglobina hacia la izquierda, aumentando el porcentaje de saturación de la hemoglobina.

Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

Mediante este análisis, se seleccionaron un subconjunto de las variables del estudio con el fin de construir un buen predictor de la Hipertensión Pulmonar Persistente en el Recién Nacido⁷⁰. El objetivo es lograr un modelo predictivo de la PAP, mediante la determinación de otras variables clínicas de medición más sencilla, y de este modo tener que evitar cateterizar al neonato. Este análisis nos permitiría extraer valores predictivos, y se puede usar como una alternativa de diagnóstico de HAP⁷¹.

Para este análisis se convirtió como variable dependiente la PAP, eliminándose de la matriz de variables los parámetros calculados por ella. Al realizar una primera regresión con todas las variables, se observan muy buenos valores de bondad de ajuste (r^2) y una pendiente con significancia distinta a cero de la curva ($p < 0.001$) entre nuestros valores predichos y los valores reales¹⁴.

Estos dos algoritmos de modelamiento representan al menos la combinación de tres componentes principales. Al analizar las variables de manera independiente por condición de altura, podemos observar en azul aquellas variables con valor importante de vector de regresión (*loading*) y correlación con la ecuación lineal generada. En tierras bajas podemos observar que destacan como variables de modelamiento HR, pO₂, %Sat y ContO₂, mientras que en tierras altas HR, pH, pCO₂ pO₂ %Sat, ContO₂ y Hb. A raíz de esto, podemos concluir que en nuestro modelo de HPPN (animales de tierras altas), HR, pH, pCO₂, %Sat, ContO₂ y Hb son variables que influyen significativamente en la HAP, lo que sustenta nuestra investigación, ya que, en el diagnóstico clásico, estas variables no son consideradas.

Con el fin de considerar un modelo común para ambas condiciones de altura, las matrices de datos se combinaron, tomando en cuenta solo variables de interés generadas por el análisis independiente por condición de altura mencionado en el párrafo anterior, generando una ecuación de modelamiento final, la cual se sometió a una matriz de confusión de parámetros internos para ser validada, obteniéndose excelentes y promisorios parámetros de modelamiento con una sensibilidad de 97,4%, Especificidad de 88,2 % y razones de similitud positivo de 8,28 y negativo

de 0,03. Al obtener un alto porcentaje de sensibilidad, me indicó que nuestro método es adecuado ya que fue capaz de clasificar a los sujetos enfermos y nuestro alto porcentaje de especificidad nos detectó de forma adecuada a los sujetos realmente sanos, finalmente los valores de las razones de similitud positiva nos confirma que un diagnóstico de HAP es 8,25 veces más frecuente en individuos con HAP que en individuos sin la enfermedad, finalmente la prueba negativa indica que la HAP es 0.03 veces más frecuente en individuos con HAP que en pacientes sin ella. Dicha relación se acerca a los óptimo para diagnóstico predictor que indica una razón de verosimilitud positiva de 10 o más y una razón de verosimilitud negativa de 0.01 o menos.

Es por esto que nuestro modelamiento final nos permite demostrar que hay otras variables que pueden ser consideradas en el momento del diagnóstico como lo son pH, pCO₂, %Sat, Cont O₂ y Hb, mostradas en la última ecuación de PLS. Además, es importante recalcar que nuestro modelo es factible en un grupo pequeño de individuos, por lo tanto, queda como proyección para un nuevo estudio ampliar nuestro n y a la vez validarlo en un grupo de individuos externo.

Finalmente es importante señalar que los resultados de nuestra investigación permiten ayudar a mejorar la evaluación clínica, el diagnóstico, incluso tener una alternativa para obtener los valores PAP, sin utilizar la metodología actual de cateterismo invasivo las cuales podrían generar complicaciones adicionales al tratarse de neonatos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barst RJ, Ertel SI, Beghetti M, Ivy DD. Pulmonary arterial hypertension: A comparison between children and adults. *European Respiratory Journal*. 2011;37(3). doi:10.1183/09031936.00056110
2. Barberà J, Blanco I, Callejas J, et al. Protocolos, Nuevos retos en hipertensión pulmonar. *Sociedad Española de Medicina Interna*. Published online 2019:1-10. Accessed April 9, 2021. <https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/protocolo-hipertension-pulmonar-2019.pdf>
3. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: The clinical syndrome. *Circulation Research*. 2014;115(1). doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.301146
4. Teng RJ, Wu TJ. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2013;112(4). doi:10.1016/j.jfma.2012.11.007
5. Lakshminrusimha S, Steinhorn RH. Pulmonary vascular biology during neonatal transition. *Clinics in Perinatology*. 1999;26(3):601-619. doi:10.1016/s0095-5108(18)30039-3
6. Abman SH. Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. In: *Neonatology*. Vol 91. ; 2007. doi:10.1159/000101343
7. Gao Y, Raj JU. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Physiological Reviews*. 2010;90(4). doi:10.1152/physrev.00032.2009
8. Hillman NH, Kallapur SG, Jobe AH. Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clinics in Perinatology*. 2012;39(4). doi:10.1016/j.clp.2012.09.009
9. Hooper SB, te Pas AB, Lang J, et al. Cardiovascular transition at birth: A physiological sequence. *Pediatric Research*. 2015;77(5). doi:10.1038/pr.2015.21
10. Haworth S. Development of the normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Experimental Physiology*. 1995;80(5). doi:10.1113/expphysiol.1995.sp003892
11. Penaloza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: Healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation*. 2007;115(9). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624544
12. Beñaldo F. FA, Ferrada D JC, Castillo G. S, Ebensperger D. G. Mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar neonatal. Una perspectiva molecular. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*. 2017;33(4). doi:10.4067/s0717-73482017000400308
13. Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, et al. High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2007;292(6). doi:10.1152/ajpregu.00909.2006

14. González-Candia A, Candia AA, Ebensperger G, Reyes R v., Llanos AJ, Herrera EA. The newborn sheep translational model for pulmonary arterial hypertension of the neonate at high altitude. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. Published online 2020. doi:10.1017/S2040174420000616
15. Arias D, Narváez C. Atención al recién nacido con hipertensión pulmonar persistente. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 2016;25(4). doi:10.1016/j.reper.2016.10.008
16. Lakshminrusimha S, Keszler M. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *NeoReviews*. 2015;16(12). doi:10.1542/neo.16-12-e680
17. Benza RL, Park MH, Keogh A, Girgis RE. Management of Pulmonary Arterial Hypertension With a Focus on Combination Therapies. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2007;26(5). doi:10.1016/j.healun.2007.01.035
18. Hara S, Morishita R, Tone Y, et al. Overexpression of Prostacyclin Synthase Inhibits Growth of Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;216(3). doi:10.1006/bbrc.1995.2701
19. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(2). doi:10.1056/nejm199207093270202
20. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1994;267(5 36-5). doi:10.1152/ajpheart.1994.267.5.h1921
21. Hill NS, Farber HW. *Pulmonary Hypertension*. Humana Press; 2008.
22. Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, et al. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(11). doi:10.1172/JCI5911
23. Giaid A, Saleh D. Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(4). doi:10.1056/nejm199507273330403
24. Castillo-Galán S, Quezada S, Moraga F, et al. 2-Aminoethyldiphenylborinate modifies the pulmonary circulation in pulmonary hypertensive newborn lambs partially gestated at high altitude. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016;311(4). doi:10.1152/ajplung.00230.2016
25. Barrington KJ, Finer N, Pennaforte T, Altit G. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;2017(1). doi:10.1002/14651858.CD000399.pub3
26. Kilchemmann Fuentes C, Vallejos Vallejos C, Román Navarro A. Cost effectiveness and budget impact analysis of inhaled nitric oxide in a neonatal unit from the perspective of the public health system. *Rev chil pediatr*. 2016;87(6). doi:10.1016/j.rchipe.2016.05.002

27. Torregrosa S, Paz Fuset M, Castelló A, et al. Oxigenación de membrana extracorpórea para soporte cardíaco o respiratorio en adultos. *Cirugía Cardiovascular*. 2009;16(2). doi:10.1016/s1134-0096(09)70162-7
28. Kattan S. J, González M. Á, Castillo M. A. Oxigenación con membrana extracorpórea neonatal-Pediátrica. *Revista Chilena de Pediatría*. 2013;84(4). doi:10.4067/S0370-41062013000400002
29. MINSAL. Síndrome de Dificultad Respiratoria en el recién nacido.
30. Kelly LE, Ohlsson A, Shah PS. Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;2017(8). doi:10.1002/14651858.CD005494.pub4
31. Ministerio de Salud C. *Manejo Clínico de La Hipertensión Pulmonar Grupo I*. Accessed March 11, 2021. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/08/Orientaciones-HAP.pdf>
32. B. MZ, V. ML. HIPERTENSIÓN PULMONAR: IMPORTANCIA DE UN DIAGNÓSTICO PRECOZ Y TRATAMIENTO ESPECÍFICO. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015;26(3). doi:10.1016/j.rmclc.2015.06.009
33. Barberà JA, Román A, Gómez-Sánchez MÁ, et al. Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Summary of Recommendations. *Archivos de Bronconeumología*. 2018;54(4). doi:10.1016/j.arbres.2017.11.014
34. Samson N, Fortin-Pellerin E, Praud JP. The contribution of ovine models to perinatal respiratory physiology. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2018;23(7). doi:10.2741/4639
35. de Las Heras Guillamón M, Borderías Clau L. La oveja como modelo experimental de animal grande en la investigación de patologías respiratorias. *Archivos de Bronconeumología*. 2010;46(10). doi:10.1016/j.arbres.2010.06.005
36. Björklund LJ, Ingimarsson J, Curstedt T, et al. Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatric Research*. 1997;42(3). doi:10.1203/00006450-199709000-00016
37. Palmieri TL, Enkhbaatar P, Bayliss R, et al. Continuous nebulized albuterol attenuates acute lung injury in an ovine model of combined burn and smoke inhalation. *Critical Care Medicine*. 2006;34(6). doi:10.1097/01.CCM.0000217215.82821.C5
38. Wolfson MR, Funanage VL, Kirwin SM, et al. Recombinant human Clara cell secretory protein treatment increases lung mRNA expression of surfactant proteins and vascular endothelial growth factor in a premature lamb model of respiratory distress syndrome. *American Journal of Perinatology*. 2008;25(10). doi:10.1055/s-0028-1090587
39. Erickson BJ, Korfiatis P, Akkus Z, Kline TL. Machine learning for medical imaging. *Radiographics*. 2017;37(2). doi:10.1148/rg.2017160130
40. Bini SA. Artificial Intelligence, Machine Learning, Deep Learning, and Cognitive Computing: What Do These Terms Mean and How Will They Impact Health Care? *Journal of Arthroplasty*. 2018;33(8). doi:10.1016/j.arth.2018.02.067

41. Sidey-Gibbons JAM, Sidey-Gibbons CJ. Machine learning in medicine: a practical introduction. doi:10.1186/s12874-019-0681-4
42. Handelman GS, Kok HK, Chandra R v, et al. eDoctor: machine learning and the future of medicine. doi:10.1111/joim.12822
43. Fernandes A, Vinga S. Improving Protein Expression Prediction Using Extra Features and Ensemble Averaging. Published online 2016. doi:10.1371/journal.pone.0150369
44. Ramírez Álvarez CE, Vergara Berríos FS. Prevalencia de etiologías del Síndrome de Dificultad Respiratoria del Recién Nacido. Perfil materno y neonatal en centro Neonatal. *Matronería Actual*. 2020;(1). doi:10.22370/rev.mat.1.2020.2186
45. López V, Moraga FA, Llanos AJ, Ebensperger G, Taborda MI, Uribe E. Plasmatic concentrations of ADMA and homocystein in llama (*Lama glama*) and regulation of arginase type II: An animal resistant to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *Frontiers in Physiology*. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fphys.2018.00606
46. Nachar RA, Pastene CM, Herrera EA, et al. Low-dose inhaled carbon monoxide reduces pulmonary vascular resistance during acute hypoxemia in adult sheep. *High Altitude Medicine and Biology*. 2001;2(3). doi:10.1089/15270290152608552
47. Glantz S, Slinker B. *Primer of Applied Regression Analysis of Variance*. Third Edition.
48. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*. 2008;26(3). doi:10.1038/nbt0308-303
49. Mazzolari A, Sommaruga L, Pedretti A, Vistoli G. MetaTREE, a Novel Database Focused on Metabolic Trees, Predicts an Important Detoxification Mechanism: The Glutathione Conjugation. *Molecules*. 2021;26(7). doi:10.3390/molecules26072098
50. Barberà JA, Román A, Gómez-Sánchez MÁ, et al. Guía de diagnóstico y tratamiento de la hipertensión pulmonar: resumen de recomendaciones. *Archivos de Bronconeumología*. 2018;54(4). doi:10.1016/j.arbres.2017.11.014
51. Qari SA, Alsufyani AA, Muathin SH. Prevalence of Respiratory Distress Syndrome in Neonates. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2018;70(2). doi:10.12816/0043086
52. Hermansen CL, Lorah KN. Respiratory distress in the newborn. *American Family Physician*. 2007;76(7). doi:10.5005/jp/books/12113_15
53. Bancalari A, Araneda H, Echeverría P, Marinovic A, Manríquez C. Arterial oxygen saturation and heart rate in term newborn in the first hour after birth. *Revista Chilena de Pediatría*. 2019;90(4). doi:10.32641/rchped.v90i4.964
54. Azad P, Stobdan T, Zhou D, et al. High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95(12). doi:10.1007/s00109-017-1584-7
55. Reyes R v., Díaz M, Ebensperger G, et al. The role of nitric oxide in the cardiopulmonary response to hypoxia in highland and lowland newborn llamas. *Journal of Physiology*. 2018;596(23). doi:10.1113/JP274340
56. Espinoza FA, Oliver JM, Wilson BS, Steinberg SL. Using Hierarchical Clustering and Dendrograms to Quantify the Clustering of Membrane

- Proteins. *Bull Math Biol.* 2012;74(1):190-211. doi:10.1007/s11538-011-9671-3
57. Parikh KS, Rao Y, Ahmad T, Shen K, Felker GM, Rajagopal S. Novel approach to classifying patients with pulmonary arterial hypertension using cluster analysis. *Pulmonary Circulation.* 2017;7(2):486-493. doi:10.1177/2045893217705891
 58. Leha A, Hellenkamp K, Unsö Ld B, et al. A machine learning approach for the prediction of pulmonary hypertension. Published online 2019. doi:10.1371/journal.pone.0224453
 59. Nakanishi K, Tajima F, Osada H, et al. Pulmonary, vascular responses in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia at two different altitude levels. *Pathology Research and Practice.* 1996;192(10). doi:10.1016/S0344-0338(96)80049-5
 60. Rodríguez I, González M. Physiological mechanisms of vascular response induced by shear stress and effect of exercise in systemic and placental circulation. *Frontiers in Pharmacology.* Published online 2014. doi:10.3389/fphar.2014.00209
 61. Herrera E v, Ebensperger GD, Riquelme RG, et al. *Respuesta Cardiopulmonar a Cambios de Oxigenación En Nacidos de Ovejas de Diferentes Altitudes.*; 2011.
 62. Trompetero González AC, Mejía EC, Benavides Pinzón WF, Serrato M, Landinéz MP, Rojas J. Comportamiento de la concentración de hemoglobina, el hematocrito y la saturación de oxígeno en una población universitaria en Colombia a diferentes Alturas. *Nutricion Hospitalaria.* 2015;32(5). doi:10.3305/nh.2015.32.5.9711
 63. Johnson RA. A Quick Reference on Respiratory Alkalosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2017;47(2). doi:10.1016/j.cvsm.2016.10.005
 64. Llanos AJ, Ebensperger G, Herrera EA, et al. The heme oxygenase-carbon monoxide system in the regulation of cardiorespiratory function at high altitude. *Respiratory Physiology and Neurobiology.* 2012;184(2). doi:10.1016/j.resp.2012.05.003
 65. Moya AC, Bascuñán PDP. Cardiopulmonary interactions: From physiology to clinic. *Revista Chilena de Pediatría.* 2018;89(5). doi:10.4067/S0370-41062018005000905
 66. Garrido E, Botella de Maglia J, Castillo O. Mal de montaña de tipo agudo, subagudo y crónico. *Revista Clínica Española.* Published online 2020. doi:10.1016/j.rce.2019.12.013
 67. Mejía Chew CR, Alcolea Batres S, Ríos Blanco JJ. Actualización en hipertensión arterial pulmonar. *Revista Clínica Española.* 2016;216(8):436-444. doi:10.1016/j.rce.2016.04.002
 68. Rey S, Valdés G, Iturriaga R. Fisiopatología de la hipertensión asociada al síndrome de apnea obstructiva del sueño: Evidencia de estudios clínicos y modelos animales de hipoxia crónica intermitente. *Revista Médica de Chile.* 2007;135(10). doi:10.4067/s0034-98872007001000016

69. Farrukh IS, Gurtner GH, Terry PB, et al. Effect of pH on pulmonary vascular tone, reactivity, and arachidonate metabolism. *Journal of Applied Physiology*. 1989;67(1). doi:10.1152/jappl.1989.67.1.445
70. Fernández Pierna JA, Abbas O, Baeten V, Dardenne P. A Backward Variable Selection method for PLS regression (BVSPLS). *Analytica Chimica Acta*. 2009;642(1-2):89-93. doi:10.1016/j.aca.2008.12.002
71. Dufresne L, Oualkacha K, Forgetta V, Greenwood CM. Pathway analysis for genetic association studies: To do, or not to do? That is the question. In: *BMC Proceedings*. Vol 8. ; 2014. doi:10.1186/1753-6561-8-S1-S103
72. González H, Calleja A, Gómez-Escudero G, Rodríguez A, López de Lacalle L. Los conceptos de Machine Learning y Deep Learning en la industria. *Metamecánica*. Published online 2021. Accessed June 22, 2021. <https://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/347471-Los-conceptos-de-Machine-Learning-y-Deep-Learning-en-la-industria.html>