

PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA FISIOLÓGÍA NORMAL DE LA VÍA AÉREA Y SUS IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN PULMONAR

MANUEL CHINCHILLA, MD¹, FABIO BOLIVAR², CARLOS LUENGAS, MD¹, MELVIN RINCÓN MD¹,
ISABEL BOLIVAR, MD¹, PATRICIO LÓPEZ-JARAMILLO, MD, PHD^{1,3}.

¹ Grupo VILANO, Fundación Cardiovascular de Colombia, Floridablanca, Colombia. ² Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, Colombia. ³ Facultad de Medicina Universidad de Santander (UIDES), Bucaramanga, Colombia.

Resumen

La hipertensión pulmonar es una patología de la microvasculatura pulmonar, caracterizada por un estado de vasoconstricción, proliferación endotelial, proliferación de músculo liso y trombosis. Se han implicado diversas moléculas en su etiología, demostrándose una producción elevada de agentes vasoconstrictores, mitogénicos, protrombóticos y mediadores proinflamatorios como tromboxano A₂, endotelina (ET), el inhibidor del activador del plasminógeno y una menor producción de sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina (PGI₂) y el óxido nítrico (ON), que en condiciones fisiológicas actúa modulando el tono basal de los vasos pulmonares y también como mediador inflamatorio e inmunomodulador. La histopatología de las lesiones en la hipertensión pulmonar sugiere que el daño en el endotelio y los estímulos proliferativos son procesos fundamentales de su desarrollo, desencadenados por alteraciones en la producción o en la actividad del ON, ocasionados por acumulación de radicales libres que lleva a menor biodisponibilidad del ON. En el presente artículo se revisa el papel que juega el ON en la fisiología normal de la vía aérea y sus implicaciones en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar.

Palabras clave: hipertensión pulmonar, óxido nítrico, endotelina, prostaciclina, endotelio vascular.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE (NO) IN THE NORMAL PHYSIOLOGY OF THE AIRWAY AND ITS IMPLICATIONS ON THE PATHOPHYSIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION

Abstract

Pulmonary hypertension is a disease of the pulmonary microvasculature characterized by vasoconstriction, smooth muscle and endothelial proliferation, and thrombosis. Many molecules have been implicated in the etiology, demonstrating an increased production of vasoconstrictor agents as well as mitogenic, prothrombotic and inflammatory mediators such as tromboxano A₂, endothelin (ET), and the inhibitor of the plasminogen activator, together with a low production of vasodilator substances such as prostacyclin (PGI₂) and nitric oxide (NO), which in physiological conditions, acts as a modulator of the basal tones of the pulmonary vessels, an inflammatory mediator, and an immunomodulator. The histopathology of the injuries in pulmonary hypertension, triggered by the alteration in the production or activity of NO, which is caused by an accumulation of free radicals that leads to lower bioavailability

* Correspondencia: jplopezj@hotmail.com Dirección postal: Calle 155ª # 23-58, 3 piso. Instituto de Investigación, Fundación Cardiovascular de Colombia, Floridablanca, Colombia.
Recibido: Abril 30 de 2008. Aceptado: Noviembre 12 de 2008

of NO, suggests that the damage in the endothelium and the proliferative stimulus are fundamental processes for their development. This article reviews the role played by NO in the normal physiology of the airway and its implications on the pathophysiology of pulmonary hypertension.

Keywords: hypertension pulmonary, nitric oxide, endothelin, epoprostenol, vascular endothelial.

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA FISIOLÓGIA NORMAL DA VIA AÉREA E SEUS IMPLICAÇÕES NA FISIOPATOLOGÍA DA HIPERTENSÃO PULMONAR

Resumo

A hipertensão pulmonar é uma patologia da microvasculatura pulmonar, caracterizada por um estado de vasoconstrição, proliferação endotelial, proliferação de músculo liso e trombose. Implicaram-se diversas moléculas na sua etiologia, demonstrando-se uma produção elevada de agentes vasoconstritores, miogênicos, pro trombóticos e mediadores proinflamatórios como tromboxano A₂, endotelina (ET), o inibidor do ativador do plasminógeno e uma menor produção de substâncias vasodilatadoras como a prostaciclina (PGI₂) e o óxido nítrico (ON), que em condições fisiológicas atua modulando o tom basal dos copos pulmonares e também como mediador inflamatório e imunomodulador. A histopatológica das lesões na hipertensão pulmonar sugere que o dano no endotélio e os estímulos proliferativos são processos fundamentais de seu desenvolvimento, desencadeados por alterações na produção ou na atividade do ON, ocasionados por acumulação de radicais livres que leva a menor biodisponibilidade do ON.

Palavras-chave: hipertensão pulmonar, óxido nítrico, endotelina, epoprostenol, endotélio vascular

Introducción

La hipertensión pulmonar (HTP) es una enfermedad caracterizada por proliferación y remodelación vascular de los pequeños vasos pulmonares, lo que resulta en un incremento progresivo de la resistencia vascular y, finalmente, en falla ventricular derecha y muerte (1). Se define como una elevación de la presión media de la arteria pulmonar en 25 mmHg y 30 mmHg con ejercicio, con una presión de 15 mmHg de fin de diástole, en el ventrículo izquierdo (2). Clínicamente se manifiesta por disnea progresiva, cianosis, *discomfort* precordial, angina y cardiomegalia. A nivel histológico, los vasos arteriales pulmonares exhiben diferentes grados de engrosamiento de la íntima e hipertrofia del músculo liso vascular (3,4), que finalmente, en estados avanzados de la enfermedad, constituyen la denominada “arteriopatía plexiforme”, una lesión caracterizada por proliferación endoluminal. Se ha sugerido que las células endoteliales constituyen estas lesiones, pero evidencias recientes sugieren que son miofibroblastos (5).

La HTP es clasificada como primaria o idiopática, cuando no se conoce -o no se documenta- la causa

que explique esta condición y como secundaria, en presencia de una patología subyacente. Sin embargo, existe controversia en cuanto a esta clasificación, debido a la falta de diferencias histológicas, patológicas y en la respuesta al tratamiento, en ambas clases de HTP. Es una enfermedad rara, con una incidencia anual de uno por cada millón de habitantes, siendo esporádicos la gran mayoría de casos; sólo en un 6% al 12% de ellos hay una herencia autosómica dominante, con una reducida penetrancia (6). La HTP ocurre con mayor frecuencia en mujeres, con una relación de 3:1 respecto de los hombres (7). En la década de los 80 la supervivencia era de 2,8 años posterior al diagnóstico y los estudios de seguimiento han reportado supervivencias a uno, tres y cinco años de 68% al 77%, 40% al 56% y 22% al 38% respectivamente (8).

Diversas moléculas han sido implicadas en la patogénesis de la HTP y en los cambios que ocurren a nivel vascular, representados por un estado de vasoconstricción, proliferación endotelial, proliferación de músculo liso y trombosis. Es posible que estos cambios sean el resultado de la alteración normal entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, entre factores inhibitorios del crecimiento y factores mitogénicos y entre

sustancias protrombóticas y antitrombóticas (6,9,10). Normalmente el endotelio pulmonar mantiene una resistencia vascular baja, suprime el crecimiento del músculo liso vascular e inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, pero en los pacientes con HTP, el endotelio pierde, o no es capaz de mantener estas funciones vasoprotectoras, observándose una producción elevada de agentes vasoconstrictores, mitogénicos, protrombóticos y de mediadores proinflamatorios como el tromboxano A₂, la endotelina (ET), el inhibidor activador del plasminógeno y una menor producción de sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina (PGI₂) y el óxido nítrico (NO) (11). Los niveles en orina de 6-ketoprostaglandina F₂α, un metabolito de la PGI₂, se encuentran disminuidos, mientras que los niveles del metabolito del tromboxano A₂, el tromboxano B₂, se encuentran incrementados (12). Los niveles de ET-1, un potente vasoconstrictor y estimulador de la proliferación del músculo liso, también se encuentran incrementados en el plasma de pacientes con HTP (13).

Entre las sustancias vasoactivas propuestas en la patogénesis de la HTP, el NO es el que mas expectativas ha generado, habiéndose dilucidado durante la última década, los múltiples roles que esta sustancia juega en la fisiología de la vía aérea, así como su implicación en la fisiopatología de algunas enfermedades respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la hipertensión pulmonar. En este artículo revisa el papel que juega el NO en la fisiología normal de la vía aérea y sus implicaciones en la fisiopatología de la HTP.

1. NO y sus implicaciones en la fisiología de la vía aérea

El NO es un gas simple, conocido por mucho tiempo como contaminante ambiental en la combustión de los derivados del petróleo en los automotores y como componente de tabaco, siendo involucrado también en la destrucción de la capa de ozono y en la producción de la lluvia ácida. Sin embargo, hace 20 años, el NO fue caracterizado como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (14,15). Múltiples estudios se han desarrollado en busca de aclarar las funciones que este simple gas, compuesto por un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno, juega en la regulación fisiológica de la economía corporal, así como sus implicaciones en la fisiopatología y evolución de algunas enfermedades, especialmente en aquellas relacionadas con el sistema cardiovascular, inmunológico y nervioso, sitio este en donde funciona como neurotransmisor (16,17).

El NO se genera a partir de la oxidación de L-arginina, por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de la cual se conocen tres isoformas: la NOS neuronal, (nNOS) ubicada en el cromosoma 12, la NOS inducible (iNOS), ubicada en el cromosoma 17 y la NOS endotelial (eNOS), ubicada en el cromosoma 7. A diferencia de la iNOS, independiente de calcio, la nNOS y la eNOS si dependen de la concentración de este elemento (18). Mediante la oxidación de L-arginina, un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno, generan NO y L-citrulina en cantidades equimolares (16). El NO difunde rápidamente desde su sitio de síntesis, penetra las membranas celulares y se une al extremo ferrínico del componente heme de la guanilato ciclasa soluble (sGC), lo que estimula la conversión del GTP al cGMP, que finalmente media los efectos biológicos del NO.

Mientras que el NO producido por acción de la eNOS y nNOS modula el tono basal de los vasos pulmonares, el NO liberado por la acción de la iNOS actúa en el sistema inmune inhibiendo la replicación de células tumorales, virales y otros patógenos, mediante un mecanismo de inactivación de la reductasa de ribonucleótidos que inhibe la síntesis de ADN por y también por desaminación directa del ADN (16). Además, juega un rol mediador proinflamatorio e inmunomodulador en algunas patologías del aparato respiratorio, habiéndose reportado concentraciones altas de NO en el aire exhalado de pacientes con desordenes inflamatorios de la vía aérea como el asma (19). Se ha descrito que la producción de NO bajo condiciones patológicas y estados de estrés oxidativo deriva de la producción de especies reactivas de nitrógeno, que pueden modular y amplificar la respuesta inflamatoria, ocasionado en parte por la interacción de NO con el anión superóxido (O₂⁻), que lleva a la producción de peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula altamente citotóxica y capaz de ocasionar daño tisular por si misma, o por la generación de otros radicales libres (19).

Poco después que el EDRF fue identificado como NO, algunas investigaciones sugirieron que esta molécula estaba implicada en la regulación de la función del aparato respiratorio (20). Ensayos que utilizaron NO inhalado como un vasodilatador pulmonar selectivo (21) y, otros que midieron la concentración de NO en el aire exhalado por humanos y algunos mamíferos, demostraron el rol modulador de NO en la circulación pulmonar (22,23). Varios tipos celulares de la vía aérea, como las epiteliales y las inflamatorias, pueden producir NO, que en los nervios del sistema no coli-

nérgico no adrenérgico (NANC), puede actuar como un neurotransmisor inhibitorio. Como en los humanos las vías aéreas centrales y periféricas responden al NO neuronal con broncodilatación, se ha propuesto que la función del NO en la vía aérea es la dilatación del músculo liso bronquial (24). Mientras que el NO, al igual que los donadores de NO, relajan el músculo de la vía aérea *in vitro* y en pacientes asmáticos, en los que se produce broncoconstricción inducida por metacolina hay un efecto broncodilatador en respuesta a la inhalación de NO (25), la inhibición de la producción de NO aumenta la respuesta de la vía aérea a los agentes contráctiles en estos mismos pacientes (26).

En cuanto a la expresión de la familia de las NOS en la vía aérea, las tres isoformas se encuentran presentes. La eNOS se expresa constitutivamente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos pulmonares, en el epitelio bronquial, en las células alveolares tipo II y en el epitelio de la mucosa nasal (27,28). La nNOS se localiza a nivel de los nervios de la vía aérea, donde el NO es un mediador para la relajación del músculo liso bronquial. La iNOS no solamente se localiza a nivel de los macrófagos, sino también en otras células como las alveolares tipo II, fibroblastos, musculares lisas, vasculares, neutrófilos y condrocitos (27,28). Los estímulos que causan activación de la transcripción de iNOS incluyen mediadores endógenos como las citoquinas y algunos factores exógenos como toxinas bacterianas, virus, alérgenos y contaminantes ambientales.

NO y desarrollo pulmonar

Durante el periodo fetal, cuando ocurre el desarrollo del pulmón, se expresan la nNOS y la eNOS. Por métodos cuantitativos para detección de mRNA y por análisis inmunohistoquímicos se ha podido revelar que la expresión de la isoforma eNOS aumenta durante el desarrollo fetal del pulmón, siendo posible que el aumento de la eNOS contribuya a la marcada angiogénesis y al crecimiento pulmonar que existe durante este periodo, en especial en el tercer trimestre. Además, experimentos en pulmones fetales de oveja han permitido observar que la expresión de eNOS es mayor a nivel del epitelio bronquial proximal, estando ausente en los bronquiolos respiratorios y en el epitelio alveolar (30,31).

NO y su papel en la broncodilatación

Por medio de la activación de la sGC, que ocasiona un aumento en las concentraciones de cGMP, el NO

induce relajación del músculo liso de la vía aérea. Experimentalmente se ha observado, en animales anestesiados, que la broncoconstricción inducida por metacolina se reduce de una manera dosis dependiente por la inhalación de NO y que cuando se agrega NO al gas inspirado, se previene la resistencia de la vía aérea en respuesta a la metacolina (32). Existe también evidencia de que además de la relajación inducida por la activación de la guanilato ciclasa, el NO es capaz de inducir relajación en el músculo liso bronquial por un mecanismo mediado por nitrosotioles (RS-NO), los cuales tienen una vida media mayor que el NO y poseen una actividad broncodilatadora potente e independiente de cGMP (33,35). Se ha sugerido que como en pacientes asmáticos severos existe una disminución en la concentración de los RS-NO, una deficiencia en este mecanismo broncodilatador es ocasionada por una degradación acelerada de RS-NO, lo que contribuye a la severidad y a la refractariedad del broncoespasmo (36).

NO y su relación con el sistema NANC

Además del sistema adrenérgico y colinérgico que modulan el tono broncomotor, hay un sistema no colinérgico, no adrenérgico, NANC, descrito en las vías aéreas de humanos y animales, en el que NO actúa como el neurotransmisor (37,39). Por acción de la nNOS, activada por la entrada de calcio cuando el nervio es despolarizado, se libera NO, postulándose que por su acción, se media la mitad de la respuesta de relajación en el sistema NANC (37). Al parecer, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) está involucrado en la segunda parte de esta respuesta relajante del sistema NANC, aunque hay autores que proponen que en el ser humano, la respuesta de este sistema es completamente mediada por la acción del NO (39). Como al inhibir la nNOS se potencia la broncoconstricción neuronal colinérgica, se sugiere que el NO es un antagonista excitatorio colinérgico, que actúa postsinápticamente. Además, se ha observado que la liberación de NO en respuesta a la estimulación nerviosa, regula la magnitud de la misma al sistema NANC (40).

NO, secreciones en la vía aérea y transporte de electrolitos

El aumento de la producción de moco por las células epiteliales de la tráquea en respuesta a sustancias como el factor activador de plaquetas (PAF), la histamina y

el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), es inhibida cuando las células son previamente coincubadas con L-NAME y L-NMMA, dos inhibidores competitivos de la NOS. Además, el dinitrato de isosorbide, un donador de NO, induce un aumento significativo en las secreciones, hallazgo que sugieren que el NO regula la producción glandular de la submucosa de la vía aérea (41,42).

El NO también juega un papel importante en la motilidad ciliar del epitelio de la vía aérea y en el transporte de electrolitos. En experimentos con bovinos, previamente estimulados con isoproterenol, bradisinina y sustancia P, se ha observado que los inhibidores de la síntesis de NO disminuyen el movimiento de los cilios (43). La acción del TNF α y de la interleucina 1b (IL-1B) sobre la mayor motilidad ciliar como mecanismo de defensa, medida por activación de la iNOS, es inhibida por L-NNMA, situación que se revierte completamente por acción de la L-arginina (44). El NO es igualmente considerado un regulador fisiológico del transporte iónico a través de canales, pudiendo jugar un papel importante en la patogénesis de enfermedades pulmonares caracterizadas por hipersecreción en la vía aérea como la fibrosis quística (45,46).

NO y su relación con la circulación pulmonar

El NO está implicado en la regulación del tono basal de los vasos pulmonares y contrarresta el efecto vasoconstrictor ocasionado por la hipoxia (23). Como la expresión de la eNOS se encuentra disminuida en los pacientes con HTP (11) y se ha reportado una producción alterada de NO en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y en la hipoxia crónica (20,47), se sugiere que la vasoconstricción pulmonar y el aumento de la capa de músculo liso, características de estas patologías, son secundarias a una menor producción de NO. Mientras que la administración por vía intravenosa de L-NMMA incrementa la resistencia vascular pulmonar en sujetos normales, la administración de NO inhibe el incremento de la presión sistólica ventricular derecha asociada con la HTP, la remodelación vascular pulmonar y la hipertrofia ventricular derecha inducida por la hipoxia crónica (47).

En cuanto al papel del NO en la permeabilidad vascular existen resultados contradictorios (49), con reportes en los que el NO aumenta la extravasación de plasma inducida por algunos mediadores proinflamatorios

como la sustancia P y los leucotrienos, pero no con otros como la histamina (50). Además, el NO endógeno aumenta por estímulos de estos mediadores en la traquea y en el bronquio principal, pero no en las vías aéreas intrapulmonares, lo que hace pensar en una regulación diferente, de acuerdo al sitio anatómico de la microvasculatura pulmonar. Este aspecto, acerca del papel del NO endógeno en la microcirculación de la vía aérea, es importante para definir su rol en enfermedades como el asma (19).

2. NO y su implicación en la fisiopatología de la hipertensión pulmonar

La HTP es el más serio y devastador desorden crónico de la circulación pulmonar, enfermedad en que se presentan alteraciones hemodinámicas y que a pesar de las décadas de investigación acerca de los mecanismos moleculares por los cuales ocurre, su etiología y patogénesis permanecen aún sin establecerse, convirtiéndose en un desafío su diagnóstico y tratamiento para el personal de la salud (51). Mientras que normalmente la circulación pulmonar es un sistema con paredes arteriales delgadas de baja presión y alto flujo, en la HTP existe una obstrucción arterial pulmonar, ocasionada por proliferación y remodelación vascular, que se convierte en el sello característico de la enfermedad. El proceso de remodelación vascular involucra todas las capas y células de la pared del vaso (endotelio, músculo liso, fibroblastos, células inflamatorias y plaquetas) y el estado de vasoconstricción puede ser una alteración temprana en la génesis de la HTP, que se ha relacionado con una función anormal de los canales de potasio y con un trastorno endotelial de base (52). La disfunción endotelial media los cambios estructurales presentes en la vasculatura pulmonar, gracias a una alteración en la producción de sustancias vasoactivas (NO, PGI₂, ET-1, Serotonina, Tromboxano) que afectan el crecimiento de las células musculares lisas y que favorecen el desarrollo de hipertrofia y de remodelación vascular pulmonar. Por su parte, la proliferación endotelial desordenada, junto con la neoangiogénesis, resulta en la formación de estructuras glomeruloides conocidas como lesiones plexiformes, rasgo patológico característico de los vasos pulmonares de pacientes con HTP (9). Además, el endotelio lesionado expone el tejido vascular subyacente a factores circulantes en el plasma, que promueven cambios patológicos y alteraciones en la producción de factores anticoagulantes, ocasionando efectos adversos en la homeostasis vascular pulmonar.

La histopatología de las lesiones en la HTP sugiere que el daño endotelial y los estímulos proliferativos son procesos fundamentales en su desarrollo. Se han propuesto mecanismos genéticos que expliquen el desarrollo de esta enfermedad, en el que una alteración en el gen *BMPR2*, un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento TGF- β y el gen que codifica ALk/endoglin, podría promover una angiogénesis desordenada. Sin embargo, como menos del 20% de los individuos con este tipo de alteraciones desarrollan HTP, se piensa que sean necesarias otras alteraciones genéticas, o factores medio ambientales que permitan el desarrollo de la enfermedad (53). Mantener una resistencia vascular baja, suprimir el crecimiento del músculo liso vascular, inhibir la adhesión y agregación plaquetaria, así como disminuir la inflamación a nivel del árbol bronquial, son funciones normales del endotelio pulmonar, que están alteradas o se han perdido en los caso de HTP.

Como se ha discutido, el NO y la eNOS juegan un papel importante en la regulación del tono vascular pulmonar, tanto en condiciones normales como en la respuesta a la hipoxia, así como en los cambios de presión o de flujo, de tal manera que las alteraciones de la HTP son en parte debidas, a una disminución en su síntesis o en su actividad. Como los mecanismos por los que ocurre este fenómeno son multifactoriales, los resultados de algunos de los estudios pueden parecer contradictorios. Es así como tempranamente se describió que la expresión de la eNOS se encontraba reducida en pacientes con HTP (11), sin que esto se haya confirmado en reportes más recientes (12,54), de manera que si la eNOS se encuentra disminuida, inalterada o incrementada en estos pacientes, continúa siendo tema de debate (55,56). Recientemente se reportó que después de la infusión de L-arginina, la producción de NO estaba disminuida en pacientes con HTP (57) y que estos tenían niveles reducidos de NO exhalado (58) y de sus metabolitos urinarios (59), lo que demostraba una alteración en la producción de NO, o un incremento en su degradación, o ambas condiciones. Asimismo en la HTP, la vasodilatación endotelio dependiente en respuesta a la acetilcolina se encuentra alterada y es restaurada a niveles normales durante el tratamiento con Bosetan[®], una antagonista de ET-1, datos que soportan la propuesta de que la ET-1 es un mediador vasoactivo involucrado en la patogénesis de la HTP, al disminuir la actividad de la eNOS y la respuesta vascular pulmonar al NO (60,61).

También se ha encontrado que la biodisponibilidad del NO está reducida por incremento de estrés oxidativo y por aumento de la inactivación de NO por radicales libres de oxígeno (62). Además, la L-arginina puede estar disminuida por incremento de la actividad de la arginasa, una enzima que la degrada transformándola en ornitina y en urea y que es liberada por las células endoteliales y el eritrocito, mecanismo importante en la HTP asociada a hemólisis como sucede en la enfermedad de células falciformes, pacientes en quienes se ha demostrado, en soporte a este mecanismo, que la adición de un suplemento de arginina oral reduce su presión pulmonar en 15 mm Hg (63,64). La concentraciones disminuidas de L-arginina en plasma también pueden contribuir a la HTP persistente del recién nacido, en quienes la infusión de L-arginina disminuye la resistencia vascular pulmonar y mejora sus niveles de oxigenación.

En un modelo de HTP inducida por hipoxia crónica en roedores, se demostró mayor expresión de la eNOS a nivel pulmonar, pero una disminución paradójica del NO, contradicción que se puede explicar por un aumento en la concentración de dimetil arginina asimétrica (ADMA), el inhibidor endógeno de la síntesis de NO. Los autores demostraron que la arginina dimetilaminohidrolasa de dimetil arginina (DDAH), la encargada de degradar a la ADMA, se encontraba disminuida, lo que explicaría la acumulación de la ADMA y la menor síntesis de NO en el modelo de HTP inducida por hipoxia crónica (66,67). Se han reportado niveles elevados de ADMA en pacientes con HTP secundaria a cardiopatía congénita (68,69) y mejoría en las presiones pulmonares y en los parámetros hemodinámicas con la administración oral de L-arginina en pacientes con HTP primaria o secundaria (70). Estos resultados soportan la propuesta de que en el aumento en la resistencia vascular pulmonar que involucra diferentes mecanismos como remodelación y obstrucción de la pared del vaso e inflamación y trombosis, la vasoconstricción es una alteración temprana que se relaciona con una menor bioactividad del NO.

En conclusión, el NO tiene un papel importante en el desarrollo de HTP, tal y como se ha demostrado en humanos con niveles variables de la expresión de la eNOS, concentraciones disminuidas de NO exhalado y menores niveles de sus metabolitos estables en orina, aumento de la degradación de NO y acumulación de inhibidores endógenos de la síntesis de NO. Además,

se ha reportado mejoría de las presiones pulmonares y de algunos parámetros hemodinámicas con la administración de L-arginina, el sustrato para la síntesis de NO.

3. Estrategias terapéuticas

Una minoría, tan sólo el 12,6% de los pacientes con HTP idiopática, responde al tratamiento con bloqueadores de los canales de calcio, cuando se mide objetivamente la presión y resistencia en las arterias pulmonares (71). Si la disfunción endotelial está implicada en la fisiopatología de la HTP, tal y como lo sugiere la evidencia expuesta anteriormente, se tendrían posibles vías de intervención al reducir de la acción de la endotelina y de la PGI₂. Existen, al momento, estudios que están utilizando antagonistas del receptor de endotelina (Bosentan®, Sitaxsentan®, Ambrisentan®) y también análogos, o derivados de la PGI₂ (Teprostanil®, Beraprost®, Iloprost®) (72). La primera sustancia que mostró un beneficio sustancial en pacientes con HTP fue el epoprostenol endovenoso y posteriormente se desarrollaron varios prostanoides. Estas sustancias activan los receptores de PGI₂ en la superficie celular, así como los receptores intracelulares de sustancias antiproliferativas (73,74). Bosentan® es un antagonista de los receptores de ET, con eficacia clínica demostrada en varios estudios (75,76).

La administración de NO exógeno o de sustancias potenciadoras del NO endógeno como el sildenafil, también se ha propuesto como terapia potencial para el manejo de HTP (11,77). Aunque la inhalación de NO por corto tiempo tiene un efecto vasodilatador pulmonar y su uso por tiempo prolongado ha mostrado ser beneficioso en series pequeñas y en reportes de caso, su uso a gran escala es difícil, por la necesidad de equipos especiales para su aplicación y por su corta vida media. Además, al haberse descrito un efecto "rebote" en los parámetros hemodinámicas tras la suspensión de ON, se sigue en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, que actúen sobre el NO y sus segundos mensajeros (21,78).

El NO también ejerce su efecto al estimular la síntesis de cGMP, pero es un efecto muy corto, debido a la rápida degradación del cGMP por acción de las fosfodiesterasas (PDEs), enzimas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos, cAMP y cGMP, limitando así sus propiedades de señalización intracelular (77). De ahí,

que los inhibidores de la PDE5 tengan efectos vasodilatadores pulmonares y efectos antiproliferativos en células de músculo liso vascular (79). Las isoenzimas PDE1, PDE3, PDE4 parecen estar íntimamente comprometidas en la remodelación vascular pulmonar (80,81) y la PDE5 es expresada preferencialmente a nivel pulmonar, con un aumento en su actividad y en la expresión de su gen, demostrado en la HTP (82,83). Los inhibidores de la PDE5, sildenafil, taladafil y vardenafil, tienen perfiles inhibitorios diferentes y sus efectos terapéuticos son también distintos en enfermedad pulmonar vascular. Son inhibidores que en HTP, aumentan la respuesta vascular pulmonar al NO endógeno o inhalado (84,85), bloquean el efecto vasoconstrictor inducido por hipoxia aguda (86) y contrarrestan el efecto vasoconstrictor, posterior al retiro de la terapia con NO inhalado (87).

La guanilato ciclasa soluble (CGs) es un blanco terapéutico posible para enfermedad vascular pulmonar. La alteración de la actividad de CGs, debido a oxidación de la enzima, puede ser la causa de la pobre o ninguna respuesta al NO o a los inhibidores de la PDE5, observada en algunos pacientes con HTP (88). Los activadores de la CGs, particularmente aquellos capaces de actuar sobre la enzima activada, son potentes vasodilatadores pulmonares en modelos experimentales y actualmente se prueban en estudios clínicos para enfermedad vascular pulmonar (89,90).

También se ha observado en pacientes con HTP que la administración intravenosa de sildenafil (a través de catéter en la arteria pulmonar), reducía la resistencia vascular pulmonar de manera dosis dependiente (91) y que cuando se combinaba con Iloprost®, se aumentaba el efecto vasodilatador pulmonar de manera sinérgica. Varios estudios han reportado que pacientes con HTP de diversas causas, tratados con Iloprost®, o con NO exógeno, o con ambos, presentaban deterioro de su patología que los parámetros hemodinámicos, así como la tolerancia al ejercicio, mejoraban con la adición de sildenafil oral (92,93). Es interesante entonces que los inhibidores de la PDE5 aumenten los efectos vasodilatadores de la PGI₂, a pesar de que el mecanismo por el cual se reduce no esté entendido totalmente, siendo posible que exista una interacción entre los nucleótidos de cGMP y cAMP. Por ejemplo, cGMP inhibe la acción de la PDE3, lo que ocasiona un aumento en el contenido de cAMP, reconocido segundo mensajero de la PGI₂.

Recientemente se publicó un estudio en 278 pacientes con HTP y falla cardiaca en clase funcional I a IV, que de manera aleatoria recibieron placebo o sildenafil (20, 40, y 80 mg tres veces al día), reportándose un aumento en la distancia recorrida en la prueba de seis minutos en 45, 46 y 50 metros. Además, la clase funcional y los parámetros hemodinámicos mostraban también una mejoría significativa (84). El primer ensayo clínico comparando Bosetan® y Sildenafil se realizó durante 16 semanas en 26 pacientes con HTP, encontrándose mejoría en los resultados de la prueba de distancia recorrida en seis minutos, en la concentración de péptido natriurético atrial y en la masa del ventrículo derecho en el grupo que recibió sildenafil, sin que las diferencias fueran significativas (95).

El uso combinado de medicamentos con diferentes mecanismos de acción en el tratamiento de HTP, tales como prostanoides, antagonistas del receptor de ET e inhibidores de PDE5, emerge como una opción terapéutica importante. Se ha reportado que la adición de Bosetan® al tratamiento de pacientes que recibían prostanoides inhalados, orales o intravenosos, mejoraba la tolerancia al ejercicio y los parámetros ecocardiográficos (96). En otro trabajo se demostró que el uso combinado de esta terapia en 123 pacientes con HTP, permitió supervivencias a uno, dos y tres años, del 93%, 83,1% y 79,9% respectivamente, porcentajes más altos que los históricamente reportados en los estudios de seguimiento, realizados por los institutos nacionales de salud (58,97). Hasta el momento, la combinación de estos agentes ha demostrado ser efectiva y segura en estudios no controlados y en series de casos, siendo promisorios sus resultados. Sin embargo, estos dos agentes tienen interacciones farmacocinéticas importantes, ya que el sildenafil, al ser un inhibidor de la citocromo 3A4 (CYP3A4), aumenta las concentraciones de Bosetan® y por lo tanto, el riesgo de hepatotoxicidad. Además, la inducción del CYP3A4 por el Bosetan®, acelera el mecanismo del sildenafil, inclusive hasta en un 60% (99). Teniendo en cuenta que en la mayoría de los estudios con terapia combinada los datos se han obtenido de las doce a la dieciséis semanas, los resultados deben interpretarse con cautela, pues el efecto de la terapia a corto plazo se debe demostrar en estudios a más largo tiempo, más aún, si entre los mismos investigadores existe cuestionamiento respecto al tiempo de seguimiento óptimo en este tipo de pacientes y en cuanto a las metas de tratamiento utilizadas clásicamente para definir un beneficio en la terapia de HTP.

4. Nuevos desarrollos

Varios compuestos nuevos han mostrado resultados promisorios en modelos experimentales en HTP, incluyendo inhibidores de rho quinasa, e inhibidores de transporte de la serotonina (100,101). Además, se han hecho ensayos con células progenitoras endoteliales derivadas de médula ósea, evidenciándose reparación pulmonar en modelos animales, lo que abre la posibilidad de descubrir una terapia regenerativa (102). Igualmente, en pacientes con HTP se ha encontrado una sobreexpresión de survivina, un inhibidor de apoptosis celular descrito en células cancerosas y que en ratas, con terapia génica con adenovirus, desencadena una mutante negativa de survivina capaz de revertir la HTP (103). Asimismo, en modelos animales, se han hecho estudios con imatinib, un inhibidor de la tirosinquinasa capaz de revertir la HTP, presumiblemente por bloqueo del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (104). También se han reportado casos de pacientes con HTP refractaria a otros medicamentos, que muestran mejoría con el uso de esta sustancia (105).

Agradecimientos

A Colciencias por el soporte financiero brindado a Melvin Yesid Rincón Acelas, dentro del Programa de Jóvenes Investigadores.

Referencias

- 1) Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 2003; 361(9368):1533-1544.
- 2) Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 352(9129):719-725.
- 3) McGoon M, Guterman D, Steen V, Barst R, McCrory DC, Fortin TA et al. Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126(1 Suppl):14S-34S.
- 4) Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 1987; 107(2):216-223.
- 5) Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 1):1577-1586.
- 6) Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351(16):1655-1665.
- 7) Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* 2000; 102(22):2781-2791.
- 8) D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115(5):343-349.

- 9) Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109(2):159-165.
- 10) Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327(2):70-75.
- 11) Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333(4):214-221.
- 12) Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(6):1925-1932.
- 13) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328(24):1732-1739.
- 14) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524-526.
- 15) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789):373-376.
- 16) Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, et al. The L-arginine: nitric oxide pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17(Suppl 3): S1-S9.
- 17) Moncada S, and Lopez Jaramillo P. The Biological activity in the vascular endothelium. *Scientific American*. 1991; 176: pag 60.
- 18) Lopez-Jaramillo P, Gonzalez MC, Palmer RM, Moncada S. The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990; 101(2):489-493.
- 19) Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84(3):731-765.
- 20) Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY et al. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324(22):1539-1547.
- 21) Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338(8776):1173-1174.
- 22) Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181(2):852-857.
- 23) Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand* 1990; 140(4):449-457.
- 24) Ward JK, Barnes PJ, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in humal trachea. *J Physiol* 1995; 483 (Pt 2):525-536.
- 25) Kacmarek RM, Ripple R, Cockrill BA, Bloch KJ, Zapol WM, Johnson DC. Inhaled nitric oxide. A bronchodilator in mild asthmatics with methacholine-induced bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(1):128-135.
- 26) Ricciardolo FL, Geppetti P, Mistretta A, Nadel JA, Sapienza MA, Bellofiore S et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet* 1996; 348(9024):374-377.
- 27) Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H et al. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(4):L684-L692.
- 28) Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:749-774.
- 29) Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest* 2002; 82(4):425-441.
- 30) Parker TA, le Cras TD, Kinsella JP, Abman SH. Developmental changes in endothelial nitric oxide synthase expression and activity in ovine fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(1):L202-L208.
- 31) Shaul PW, Afshar S, Gibson LL, Sherman TS, Kerecman JD, Grubb PH et al. Developmental changes in nitric oxide synthase isoform expression and nitric oxide production in fetal baboon lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(6):L1192-L1199.
- 32) Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest* 1992; 90(2):421-428.
- 33) Gaston B, Drazen JM, Jansen A, Sugarbaker DA, Loscalzo J, Richards W et al. Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(2):978-984.
- 34) Jansen A, Drazen J, Osborne JA, Brown R, Loscalzo J, Stamler JS. The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrosothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261(1):154-160.
- 35) Perkins WJ, Pabelick C, Warner DO, Jones KA. cGMP-independent mechanism of airway smooth muscle relaxation induced by S-nitrosoglutathione. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 1):C468-C474.
- 36) Gaston B, Sears S, Woods J, Hunt J, Ponaman M, McMahon T et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998; 351(9112):1317-1319.
- 37) Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airway. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146(6):1543-1547.
- 38) Stretton D. Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18(10):675-684.
- 39) Lindsay G, Diamond L, Thompson DC, Cibulsky SM, Altieri RJ. Nitric oxide. Role as a relaxant agonist and transmitter of nonadrenergic noncholinergic inhibitory nerves in guinea pig trachea. *Chest* 1995; 107(3 Suppl):125S.
- 40) Thompson DC, Altieri RJ. Differential susceptibility of tracheal contraction to nonadrenergic noncholinergic relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284(1):19-24.
- 41) Adler KB, Fischer BM, Li H, Choe NH, Wright DT. Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13(5):526-530.
- 42) Nagaki M, Shimura MN, Irokawa T, Sasaki T, Shirato K. Nitric oxide regulation of glycoconjugate secretion from feline and human airways in vitro. *Respir Physiol* 1995; 102(1):89-95.
- 43) Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Leise KL, Sisson JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191(1):83-88.
- 44) Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH. TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Am J Physiol* 1995; 268(6 Pt 1): L911-L917.

- 45) Duszyk M, Radomski MW. The role of nitric oxide in the regulation of ion channels in airway epithelium: implications for diseases of the lung. *Free Radic Res* 2000; 33(5):449-459.
- 46) Grasmann H, Gartig SS, Wiesemann HG, Teschler H, Konietzko N, Ratjen F. Effect of L-arginine infusion on airway NO in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia syndrome. *Eur Respir J* 1999; 13(1):114-118.
- 47) Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991; 87(1):155-162.
- 48) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001; 37(2):322-327.
- 49) Kubes P. Nitric oxide and microvascular permeability: a continuing dilemma. *Eur Respir J* 1997; 10(1):4-5.
- 50) Kageyama N, Miura M, Ichinose M, Tomaki M, Ishikawa J, Ohuchi Y et al. Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediators. *Eur Respir J* 1997; 10(1):13-19.
- 51) Rubin LJ. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126(1 Suppl):4S-6S.
- 52) Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S):13S-24S.
- 53) Yuan JX, Rubin LJ. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulation* 2005; 111(5):534-538.
- 54) Xue C, Johns RA. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333(24):1642-1644.
- 55) Mason NA, Springall DR, Burke M, Pollock J, Mikhail G, Yacoub MH et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol* 1998; 185(3):313-318.
- 56) Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* 2004; 18(14):1746-1748.
- 57) Demoncheaux EA, Higenbottam TW, Kiely DG, Wong JM, Wharton S, Varcoe R et al. Decreased whole body endogenous nitric oxide production in patients with primary pulmonary hypertension. *J Vasc Res* 2005; 42(2):133-136.
- 58) Girgis RE, Champion HC, Diette GB, Johns RA, Permutt S, Sylvester JT. Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: response to bosentan therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(3):352-357.
- 59) Lara AR, Erzurum SC. A urinary test for pulmonary arterial hypertension? *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(3):262-263.
- 60) Wedgwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(3):L480-L487.
- 61) Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N et al. Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(5):506-513.
- 62) Kinsella JP, Parker TA, Davis JM, Abman SH. Superoxide dismutase improves gas exchange and pulmonary hemodynamics in premature lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(6):745-749.
- 63) Morris CR, Morris SM, Jr., Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D et al. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(1):63-69.
- 64) Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005; 294(1):81-90.
- 65) Pearson DL, Dawling S, Walsh WF, Haines JL, Christman BW, Bazyk A et al. Neonatal pulmonary hypertension-urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *N Engl J Med* 2001; 344(24):1832-1838.
- 66) Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM et al. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 108(12):1493-1498.
- 67) Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia. *Circulation* 2003; 107(8):1195-1201.
- 68) Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37(4):489-492.
- 69) Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinkel R, Haredza P, Klepetko W et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J* 2005; 19(9):1175-1177.
- 70) Nagaya N, Uematsu M, Oya H, Sato N, Sakamaki F, Kyotani S et al. Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(4):887-891.
- 71) Sitbon O, Humbert M, Jais X, Iqbal V, Hamid AM, Provencher S et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111(23):3105-3111.
- 72) Badesch DB, Abman SH, Simonneau G, Rubin LJ, McLaughlin VV. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2007; 131(6):1917-1928.
- 73) Ali FY, Egan K, FitzGerald GA, Desvergne B, Wahli W, Bishop-Bailey D et al. Role of prostacyclin versus peroxisome proliferator-activated receptor beta receptors in prostacyclin sensing by lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(2):242-246.
- 74) Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pullamsetti S, Schulz A et al. Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(3):358-363.
- 75) Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358(9288):1119-1123.
- 76) Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346(12):896-903.
- 77) Mehta S. Sildenafil for pulmonary arterial hypertension: exciting, but protection required. *Chest* 2003; 123(4):989-992.
- 78) Hasuda T, Satoh T, Shimouchi A, Sakamaki F, Kyotani S, Matsumoto T et al. Improvement in exercise capacity with nitric oxide inhalation in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 101(17):2066-2070.

- 79) Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(1):105-113.
- 80) Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(3):930-938.
- 81) Phillips PG, Long L, Wilkins MR, Morrell NW. cAMP phosphodiesterase inhibitors potentiate effects of prostacyclin analogs in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(1):L103-L115.
- 82) Hanson KA, Burns F, Rybalkin SD, Miller JW, Beavo J, Clarke WR. Developmental changes in lung cGMP phosphodiesterase-5 activity, protein, and message. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(1):279-288.
- 83) Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke WR. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1):L931-L941.
- 84) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9337):895-900.
- 85) Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002; 105(20):2398-2403.
- 86) Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A et al. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104(4):424-428.
- 87) Atz AM, Wessel DL. Sildenafil ameliorates effects of inhaled nitric oxide withdrawal. *Anesthesiology* 1999; 91(1):307-310.
- 88) Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol* 2002; 136(5):637-640.
- 89) Deruelle P, Grover TR, Abman SH. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(5):L798-L806.
- 90) Deruelle P, Grover TR, Storme L, Abman SH. Effects of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase activator, on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(4):L727-L733.
- 91) Wilkens H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B et al. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104(11):1218-1222.
- 92) Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N et al. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 2002; 136(7):515-522.
- 93) Stiebellehner L, Petkov V, Vonbank K, Funk G, Schenk P, Ziesche R et al. Long-term treatment with oral sildenafil in addition to continuous IV epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2003; 123(4):1293-1295.
- 94) Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353(20):2148-2157.
- 95) Wilkins MR, Paul GA, Strange JW, Tunariu N, Gin-Sing W, Banya WA et al. Sildenafil versus Endothelin Receptor Antagonist for Pulmonary Hypertension (SERAPH) study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(11):1292-1297.
- 96) Seyfarth HJ, Pankau H, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H, Winkler J. Bosentan improves exercise tolerance and Tei index in patients with pulmonary hypertension and prostanoid therapy. *Chest* 2005; 128(2):709-713.
- 97) Hoeper MM, Faulenbach C, Golpon H, Winkler J, Welte T, Niedermeyer J. Combination therapy with bosentan and sildenafil in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2004; 24(6):1007-1010.
- 98) Hoeper MM, Markevych I, Spiekeroetter E, Welte T, Niedermeyer J. Goal-oriented treatment and combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005; 26(5):858-863.
- 99) Paul GA, Gibbs JS, Boobis AR, Abbas A, Wilkins MR. Bosentan decreases the plasma concentration of sildenafil when coprescribed in pulmonary hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60(1):107-112.
- 100) Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D et al. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005; 111(21):2812-2819.
- 101) Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H et al. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(5):494-499.
- 102) Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 2005; 96(4):442-450.
- 103) McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1479-1491.
- 104) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115(10):2811-2821.
- 105) Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353(13):1412-1413.