

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

---



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Tesis para obtener el grado de Maestría en  
Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y  
Biología Molecular**

**“Efecto del sildenafil sobre la hipertensión  
arterial pulmonar de ratas diabéticas”**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. Miguel Ángel García González**

**Directores de Tesis:**

**Dr. José Gustavo López y López  
FCQ-BUAP**

**Dra. Verónica Vallejo Ruiz  
CIBIOR-IMSS**

**DICIEMBRE 2017**

## **Agradecimientos**

A mis padres, tutores, sinodales y amigos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013 – 2017.

## Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que genera hiperrespuesta a serotonina (5-HT), disfunción endotelial a nivel arterial pulmonar y aumenta la probabilidad de desarrollar hipertensión arterial pulmonar (HAP). El sildenafil es un medicamento que disminuye la hiperrespuesta a diversos agonistas contráctiles, aumenta la vasodilatación y mejora el estatus oxidativo, sin embargo, a la fecha no se ha evaluado su efecto en hipertensión arterial pulmonar (HAP) generada por DM, por esta razón el objetivo de este trabajo es evaluar la acción del sildenafil sobre la hipertensión arterial pulmonar inducida por la diabetes.

En este trabajo se evaluó la actividad del sildenafil sobre la reactividad vascular en anillos de arterias pulmonares, la hipertrofia ventricular derecha, y de la presión arterial pulmonar en sujetos diabéticos. Las ratas macho Sprague-Dawley se dividieron en los grupos: CTRL, DM, CTRL/SILD y DM/SILD; la DM se indujo con estreptozotocina (60 mg/Kg/V.I.P.), los grupos tratados con sildenafil fueron tratados (20 mg/Kg/día/V.O.) durante 8 semanas; al término se registró presión arterial pulmonar por canulación yugular, se obtuvo índice Fulton (VD/VI+S) y se realizaron protocolos para evaluar la función endotelial en las arterias pulmonares.

Encontramos que la presión arterial pulmonar aumentó significativamente en los animales con DM respecto a los CTRL, en el grupo DM/SILD se observó una disminución significativa respecto a los animales con DM y no se observó diferencia significativa respecto a los grupos CTRL ni respecto al grupo CTRL/SILD. En las arterias pulmonares de los animales con DM se observó hiperrespuesta a 5-HT y disfunción endotelial como mecanismos que explican el aumento de la presión arterial pulmonar e índice Fulton. Las arterias pulmonares durante la DM generan hiperrespuesta contráctil a 5-HT y disfunción endotelial, representando un mecanismo que explicaría la hipertensión arterial pulmonar, efecto que es evitado por el sildenafil y por lo tanto no se presenta la hipertrofia ventricular derecha. Además, encontramos que la diabetes genera la sobreexpresión de la PDE5 en corazón, como mecanismo involucrado en la insuficiencia cardíaca diabética, sin embargo el sildenafil evita la sobreexpresión de la PDE5 en este tejido con DM, por lo que esto podría contribuir a la reducción de la hipertrofia ventricular derecha.

## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> : Concentración intracelular del ion calcio	Ca <sup>2+</sup> : Ion calcio
5-HT: Serotonina	CAV: Caveolina
5-HT <sub>2A</sub> : Receptor a serotonina tipo 2A	CCD: Cateterismo cardiaco derecho
5-HT <sub>2B</sub> : Receptor a serotonina tipo 2B	CLM: Cadena ligera de la miosina
5-HTT: Transportador de serotonina	CLMP: Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
a.a.: Aminoácidos	CMLV: Células del músculo liso vascular
AADC: L-descarboxilasa de aminoácidos aromáticos	COX: Ciclooxygenasa
AC: Adenilato ciclase	CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
ACH: Acetilcolina	DAG: Diacilglicerol
ACoA: Acetil coenzima A	DE: Disfunción endotelial
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DE <sub>50</sub> : Dosis efectiva cincuenta
AGE: Productos de glicosilación avanzada	DM: Diabetes mellitus
A-II: Angiotensina II	DM1: Diabetes mellitus tipo 1
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	DM2: Diabetes mellitus tipo 2
AP: Arterias pulmonares	DME: Diabetes mellitus experimental
AP2: Factor de transcripción AP2	DMG: Diabetes gestacional
APO: Apocinina	ECE: Enzima convertidora de endotelinas
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
AT: Receptor de Angiotensina II	EGF: Factor de crecimiento epidérmico
ATP: Adenosín trifosfato	E <sub>max</sub> : Efecto máximo
BCC: Bloqueadores de canales de calcio	eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
BH <sub>2</sub> : Dihidrobiopterina	ENSANUT: Encuesta nacional de salud
BH <sub>4</sub> : Tetrahydrobiopterina	ET: Endotelina
Big-ET-1: Big endotelina I	ETA: Receptor tipo A de endotelina
BMPR2: Receptor tipo II de la proteína morfogenética de hueso	
BNP: Péptido natriurético cerebral	

ET<sub>B</sub>: Receptor tipo B de endotelina  
FADH: Flavín adenin dinucleótido  
GAFA: Dominio regulatorio A de la PDE5  
GAFB: Dominio regulatorio B de la PDE5  
GC: Guanilato ciclasa  
GCs: Guanilato ciclasa soluble  
GLUT: Transportador de glucosa  
GMP: Guanosín monofosfato  
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico  
GPX: Glutación peroxidasa  
Gq: Proteína G tipo q  
GTP: Guanosín trifosfato  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno  
HAP: Hipertensión arterial pulmonar  
HP: Hipertensión pulmonar  
HVD: Hipertrófia ventricular derecha  
IGF-R: Factor de crecimiento similar a la insulina  
IgG: Inmunoglobulina G  
IL: Interleucina  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IP: Receptor a prostaciclina  
IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato  
Ito: Corriente transitoria de salida acarreada por potasio  
K<sup>+</sup>: Ion potasio  
K<sub>2P</sub>: Canales de potasio de dos poros  
K<sub>ATP</sub>: Canales de potasio dependientes de ATP

K<sub>Ca</sub>: Canales de potasio activados por calcio  
KCl: Cloruro de potasio  
K<sub>IR</sub>: Canales de potasio de rectificación de entrada  
K<sub>V</sub>: Canales de potasio dependientes de voltaje  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
M3: Receptor muscarínico tipo 3  
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos  
Mg<sub>2+</sub>: Ion magnesio  
MLCK: Cinasa de la cadena ligera de la miosina  
MLCP: Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina  
Mpase: Miosina fosfatasa  
MTC: Monocrotalina  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
nNOS: Óxido nítrico sintasa neural  
NO: Óxido nítrico  
NOX: NADPH oxidasa  
NPS: Nitroprusiato de sodio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superóxido  
O<sub>2</sub>: Oxígeno molecular  
ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito  
OPG: Osteoprotegerina  
Pb. Pares de bases

pD<sub>2</sub>: Logaritmo de la dosis efectiva cincuenta  
PDE: Fosfodiesterasa  
PDE5: Fosfodiesterasa tipo 5  
PDE5i: Inhibidores de la PDE5  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina  
PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa  
PIP<sub>2</sub>: Fosfoinositol 2 fosfato  
PKA: Proteína cinasa A  
PKB: Serina/treonina cinasa Akt  
PKC: Proteína cinasa C  
PKG: Proteína cinasa G  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>  
PLC: Fosfolipasa C  
PLD: Fosfolipasa D  
PTGS<sub>2</sub>: Prostaciclina sintasa  
PVDF: Difluoruro de polivinilideno  
RNS: Especies reactivas de nitrógeno  
ROC: Entrada de calcio operada por receptor  
ROCK: Proteína cinasa asociada a Rho  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RS: Retículo sarcoplásmico  
S: Hélice transmembranal  
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SERT: Transportadores de serotonina  
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas  
SOD: Superóxido dismutasa  
Sp1: Factor de transcripción Sp1  
SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona  
STZ: Estreptozotocina  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
TPH: Triptófano hidroxilasa  
Trp: Triptófano  
TRPV1: Potencial transitorio del canal V1  
TX: Tromboxano  
TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>  
UCP-2: Proteína de desacoplamiento mitocondrial  
VD: Ventrículo derecho  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular  
VGCC: Canales de calcio controlados por voltaje  
VIP: Peptido intestinal vasoactivo  
VPH: Vasoconstricción pulmonar hipóxica  
Zn<sup>2+</sup>: Ion zinc

# INDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Página

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.1.1. Clasificación de la diabetes mellitus.....	2
1.1.2. Complicaciones de la diabetes mellitus.....	6
1.1.2.1. Cambios estructurales del endotelio .....	7
1.1.2.2. Mecanismos de disfunción endotelial .....	9
1.1.2.2.1. Estrés oxidativo.....	9
1.1.2.2.2. Activación de la vía de la proteína cinasa C.....	10
1.1.2.2.3. Productos de glicosilación avanzada.....	11
1.1.2.2.4. Activación de la vía del poliol.....	11
1.2. Hipertensión arterial pulmonar.....	12
1.2.1. Clasificación de la hipertensión arterial pulmonar.....	13
1.2.2. Factores que participan en la contracción musculo liso vascular de arterias pulmonares.....	14
1.2.2.1. El endotelio.....	14
1.2.2.1.1. El óxido nítrico .....	14
1.2.2.1.1.1. Estrés oxidativo .....	15
1.2.2.1.2. La endotelina.....	17
1.2.2.1.3. Los prostanoides.....	19
1.2.2.2. La capa muscular.....	22
1.2.2.2.1. La serotonina.....	22
1.2.2.2.2. La angiotensina II.....	26
1.2.2.2.3. Canales de potasio y calcio.....	27

1.2.2.2.4.	La capa adventicia .....	33
1.2.2.2.5.	La fosfodiesterasa tipo 5.....	34
1.2.3.	Fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar.....	41
1.2.3.1.	Metabolismo.....	43
1.2.3.2.	Genética.....	47
1.2.3.3.	Desbalance oxidativo.....	49
1.2.3.4.	Farmacoterapia.....	51
1.2.4.	Serotonina e hipertensión pulmonar.....	55
1.3.	Diabetes mellitus e hipertensión arterial pulmonar.....	60
1.3.1.	El papel del estrés oxidativo y disfunción endotelial en el vínculo diabetes hipertensión pulmonar.....	64
2.	ANTECEDENTES.....	76
3.	JUSTIFICACIÓN.....	80
4.	HIPÓTESIS.....	81
5.	OBJETIVOS.....	82
5.1.	General.....	82
5.2.	Particulares.....	82
6.	METODOLOGÍA.....	83
6.1.	Presión arterial sistémica.....	83
6.2.	Presión arterial pulmonar.....	84
6.3.	Obtención de tejidos.....	84
6.4.	Ensayos de reactividad vascular.....	85
6.4.1.	Curvas de concentración-respuesta a Ach.....	85
6.4.2.	Curvas concentración respuesta a 5-HT.....	86
6.4.3.	Análisis estadístico.....	86
6.5.	Índice Fulton.....	87
6.6.	Evaluación de la expresión de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5).....	87
6.6.1.	Western blot.....	87
6.6.2.	Quimioluminiscencia.....	88
7.	RESULTADOS.....	89
7.1.	El modelo experimental.....	89



7.2. Efecto de la diabetes sobre la relajación dependiente de óxido nítrico inducida por Ach.....	90
7.3. Efecto del sildenafil sobre la hiperrespuesta contráctil a 5-HT de la arteria pulmonar.....	92
7.4. Efecto del sildenafil sobre el estrés oxidativo de la arteria pulmonar en la diabetes mellitus.....	95
7.5. Presión arterial pulmonar.....	98
7.6. Índice Fulton.....	100
7.7. Expresión de la fosfodiesterasa tipo 5.....	101
8. DISCUSIÓN.....	103
8.1. Resultados relacionados con las ratas tratadas con estreptozotocina.....	103
8.2. Cambios en la reactividad vascular por el tratamiento con sildenafil.....	106
8.3. Efecto “protector” del sildenafil sobre la hipertensión arterial pulmonar..	112
8.4. Efecto del sildenafil sobre la hipertrofia del ventrículo derecho.....	117
8.4.1. Efectos antiinflamatorios del sildenafil en corazones diabéticos...	117
8.4.2. La inhibición de PDE5 promueve efectos similares a los antioxidantes en el corazón diabético.....	117
9. PERSPECTIVAS.....	119
10. CONCLUSIÓN.....	120
11. BIBLIOGRAFÍA.....	121

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización del óxido nítrico vascular.....	15
Figura 2. Vía de señalización de la endotelina 1.....	19
Figura 3. Mecanismo general de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos...21	
Figura 4. Vía de señalización del TXA2 y de la PGI2.....	21
Figura 5. Síntesis de la serotonina.....	24
Figura 6. Mecanismo de acción de la serotonina.....	25
Figura 7. Vasodilatación inducida por serotonina.....	25
Figura 8. Estructura y cambio conformacional del canal de potasio.....	29
Figura 9. Fosfodiesterasa cíclica 3',5'-GMPc específica.....	36
Figura 10. Mapa genético y de restricción de la región río arriba del gen PDE5A humano .....	37
Figura 11. Reacción de transformación del GTP en GMPc y su hidrolisis.....	38
Figura 12. Alteraciones morfológicas vasculares de las arterias pulmonares durante la hipertensión pulmonar .....	42
Figura 13. Desarrollo de hipertrofia ventricular derecha en pacientes hipertensos pulmonares .....	42
Figura 14. Representación esquemática de las arterias pulmonares.....	43
Figura 15. Alteraciones metabólicas más importantes que generan hipertensión arterial pulmonar .....	45
Figura 16. Mecanismos de vasoconstricción dependientes de la activación de proteínas G evocados por serotonina.....	58
Figura 17. Expresión de receptores 5-HT2A en pulmones de ratas diabéticas.....	60
Figura 18. La diabetes induce la disfunción endotelial.....	61
Figura 19. Arterias pulmonares de ratas diabéticas son hiperreactivas a 5-HT.....	61
Figura 20. La diabetes incrementa la presión arterial pulmonar.....	62
Figura 21. Evaluación de la disfunción endotelial.....	63
Figura 22. Rol de la NADPH oxidasa.....	65
Figura 23. La diabetes disminuye la expresión de BMPR2 pero no de Kv1.5.....	70
Figura 24. La diabetes induce disfunción endotelial.....	91

Figura 25. El sildenafil evita la disfunción endotelial diabética.....	92
Figura 26. La diabetes induce hiperrespuesta contráctil a la serotonina.....	93
Figura 27. El sildenafil disminuye la hiperrespuesta contráctil a serotonina.....	94
Figura 28. Efecto control del sildenafil respecto a otras terapias antihipertensivas.....	96
Figura 29. Eficacia del sildenafil respecto a otras terapias antihipertensivas pulmonares durante la diabetes.....	97
Figura 30. Eficacia del sildenafil respecto al NPS.....	98
Figura 31. El sildenafil disminuye la presión arterial pulmonar durante la diabetes.....	99
Figura 32. El sildenafil disminuye la presión de pulso arterial pulmonar durante la diabetes.....	100
Figura 33. El sildenafil evita la hipertrofia ventricular derecha.....	101
Figura 34. El sildenafil evita la sobreexpresión de la PDE5 durante la diabetes.....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la hipertensión pulmonar.....	14
Tabla 2. Datos de nuestro modelo experimental.....	90
Tabla 3. Efectos máximos y pD2.....	94
Tabla 4. Ponderación del efecto del sildenafil.....	110

## **1. Introducción**

### **1.1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la acción y/o secreción de la insulina (*American Diabetes Association*). En el ámbito internacional existen 415 millones de adultos con diabetes y se estima que para el año 2040 haya 642 millones de adultos que padezcan esta enfermedad (IDF, 2015); en México de acuerdo a datos de la ENSANUT, 2016, el 9.4% de los adultos han sido diagnosticados con algún tipo de diabetes, de los cuales, al diferenciarlo, las mujeres son las que tienen mayor prevalencia con un 10.3% contra un 8.7% para los hombres.

Algunas de las complicaciones de la DM son las enfermedades cardíacas y/o vasculares. Actualmente, el mecanismo más aceptado que explica la aparición de estas complicaciones es el aumento de estrés oxidativo que conduce a disfunción endotelial (disminución de la capacidad relajante dependiente de endotelio) inducida por la pérdida de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) favoreciendo la aparición de complicaciones vasculares como macroangiopatías (infartos cerebrales y la hipertensión sistémica) y microangiopatías (retinopatía, nefropatía y neuropatía).

Movahed y colaboradores, a partir del registro de archivos clínicos, encontraron que la hipertensión pulmonar estuvo presente en mayor porcentaje en pacientes diabéticos que en sujetos de un grupo control, concluyendo que la DM es un factor de riesgo independiente asociado a hipertensión pulmonar (HP) (Movahed y cols, 2005). En el mismo contexto, en un estudio clínico se halló que el sobrepeso y la presencia de diabetes gestacional son un factor de riesgo para la aparición de hipertensión arterial pulmonar persistente del recién nacido

(Hernández y cols, 2006). El mecanismo propuesto por el cual se pudiesen vincular la DM con la HP es la disfunción endotelial (López-López y cols, 2008), la cual es derivada del incremento del estrés oxidativo.

En la actualidad existen diversas estrategias farmacológicas dirigidas al tratamiento de la hipertensión arteria pulmonar, sin embargo, hasta la actualidad, la farmacoterapia ha resultado ser inefectiva; por lo que se han empleado nuevos fármacos como los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5, que han tenido un efecto considerable en la disminución de la hipertensión arterial pulmonar en pacientes que cursan con esta patología.

Por esta razón en la presente tesis describiremos los efectos que tiene un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 sobre la hipertensión arterial pulmonar favorecida por la presencia de DM en un modelo animal.

### **1.1.1. Clasificación de la diabetes mellitus**

La diabetes es una condición crónica que ocurre cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina que es una hormona sintetizada en el páncreas, o no puede utilizar insulina en los tejidos, y se diagnostica observando los niveles altos de glucosa en sangre. La insulina es requerida para inducir el transporte de glucosa desde la sangre al interior de las células del cuerpo donde se utiliza como energía. La falta, o ineficacia, de la insulina en las personas con diabetes significa que la glucosa continúa circulando en la sangre. Con el tiempo, la hiperglucemia causa daño a muchos tejidos del cuerpo, dando lugar al desarrollo de complicaciones para la salud que pueden ser incapacitantes y poner en peligro la vida del paciente (FID, 2015).

La DM se clasifica en tres tipos: la diabetes tipo 1 (DM1), la diabetes tipo 2 (DM2) y la diabetes gestacional (DMG); aunque existen otros tipos de diabetes menos comunes que incluyen: la diabetes monogénica, que es el resultado de una mutación genética en las vías de señalización de la insulina, y la diabetes secundaria, que surge como complicación de otras enfermedades, como trastornos hormonales (Kerner y Brückel, 2014).

La DM1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células-beta pancreáticas productoras de insulina. Como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero la aparición se da con mayor frecuencia en niños y jóvenes adultos (Smith y cols, 2017).

Las personas con esta forma de diabetes necesitan insulina todos los días para controlar los niveles de glucosa en la sangre. Sin insulina, una persona con diabetes tipo 1 moriría.

La diabetes tipo 1 puede producir síntomas como polidipsia y sequedad en la boca, poliuria, falta de energía, cansancio excesivo, polifagia, pérdida de peso repentina y visión borrosa (Smith y cols, 2017).

La diabetes tipo 1 se diagnostica por un nivel elevado de glucosa en la sangre con presencia de los síntomas listados con anterioridad. El número de personas que desarrollan diabetes tipo 1 está aumentando, las razones no están claras, pero puede ser debido a cambios en los factores de riesgo ambientales y/o infecciones virales. Con un tratamiento diario de insulina,

monitorización regular de la glucosa en sangre, y un estilo de vida sano; las personas con diabetes tipo 1 pueden llevar una vida saludable y normal (Hasslacher y Bermejo, 2017).

La DM2 es el tipo más común de diabetes. Generalmente ocurre en adultos, pero se ve cada vez más en niños y adolescentes. En la diabetes tipo 2, el cuerpo es capaz de producir insulina pero se vuelve resistente a ella, es decir las células pierden sensibilidad a esta hormona y por lo tanto disminuye la activación de señales para ingresar a la glucosa a la célula, haciendo de esta manera ineficaz a la insulina. Con el tiempo, los niveles de insulina pueden llegar a ser insuficientes. Los síntomas de la diabetes tipo 2 incluyen polidipsia, poliuria, pérdida de peso y visión borrosa (Basheer y cols, 2016).

Durante la DM2 los síntomas suelen ser menos marcados que en la DM1 y pueden tardar años en ser reconocidos. Sin embargo, durante este tiempo el cuerpo ya está siendo dañado por la hiperglucemia. Existen varios factores de riesgo para desarrollar esta patología, siendo algunos de los más importantes: el sobrepeso, inactividad física y nutrición pobre. Otros factores que juegan un papel importante son la etnicidad, historial familiar de diabetes, historial pasado de diabetes gestacional y edad avanzada.

En contraste con las personas con DM1, muchas personas con DM2 no requieren tratamiento diario de insulina para sobrevivir. El tratamiento de la DM2 se basa en la adopción de una dieta sana, aumentar la actividad física y mantener un peso corporal normal. Varios medicamentos orales están disponibles para ayudar en el control de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, si la hiperglucemia es persistente, puede que sea necesario prescribir insulina a las personas con DM2 (Piatti y cols, 2013).

Se clasifica como DMG cuando la hiperglucemia se detecta por primera vez en cualquier momento durante el embarazo. Las embarazadas con niveles de glucosa ligeramente elevados son clasificadas como mujeres que tienen diabetes gestacional, mientras que las mujeres con niveles de glucemia sustancialmente elevados son clasificadas como que tienen DM en el embarazo. La diabetes gestacional suele ocurrir a partir de la semana 24 de embarazo (Coustan, 2013).

Los síntomas evidentes de hiperglucemia durante el embarazo son raros y difíciles de distinguir de los síntomas normales de embarazo, pero pueden incluir polidipsia y poliuria. Por lo tanto, se recomienda una prueba de tolerancia oral a la glucosa. Debe llevarse a cabo al principio del embarazo en mujeres de alto riesgo, y entre las semanas de embarazo 24 y 28 en todas las mujeres. La DMG genera un riesgo mayor de resultados adversos en el embarazo como pueden ser hipertensión arterial sistémica y macrosomía fetal (Coustan, 2013).

Las mujeres con hiperglucemia durante el embarazo pueden controlar sus niveles de glucosa en sangre a través de una dieta balanceada y ejercicio. En algunos casos, puede recetarse insulina o medicación oral. La diabetes gestacional normalmente desaparece tras el parto. Sin embargo, las mujeres que han sido diagnosticadas con ella corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional en otros embarazos, así como diabetes tipo 2 más tarde en la vida. Los bebés que nacen de madres con diabetes gestacional también presentan un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en su adolescencia y juventud.



### **1.1.2. Complicaciones de la diabetes mellitus**

Las personas con diabetes tienen un mayor riesgo de desarrollar numerosos problemas de salud incapacitantes y potencialmente mortales respecto a las personas sin diabetes. Los niveles de glucosa en sangre sostenidamente altos pueden llevar a enfermedades serias que afecten el corazón y los vasos sanguíneos, los ojos, riñones y los nervios principalmente. La diabetes es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular, ceguera, enfermedad renal y amputación de las extremidades inferiores. Las complicaciones de la diabetes se pueden prevenir o retrasar manteniendo los niveles de glucemia, presión arterial y colesterol tan cerca de lo normal como sea posible, y muchas complicaciones se pueden detectar de forma temprana con programas de detección que permitan el tratamiento para prevenir que se vuelvan más complicadas (Lee y cols, 2017).

Las enfermedades cardiovasculares son consideradas como la causa más común de muerte e incapacidad entre las personas con diabetes. Éstas incluyen la angina de pecho, el infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica e insuficiencia cardíaca congestiva, además la hipertensión sistémica y colesterol elevado. Pero principalmente aparecen complicaciones cardiovasculares que incluyen: la retinopatía que puede dañar la visión o provocar ceguera, debido a que la red de vasos sanguíneos que irrigan a la retina pueden dañarse y la neuropatía, que puede afectar a cualquier tipo de nervio, y que principalmente afecta a las extremidades inferiores. La neuropatía también puede llevar a la disfunción eréctil, así como a problemas con la digestión, la micción y una serie de otras funciones; la nefropatía a causada por la hiperglucemia genera daño en los vasos sanguíneos glomerulares (Smith y cols, 2017), que puede causar insuficiencia renal. También pueden presentarse complicaciones en el embarazo, ya que niveles elevados de glucemia provocan

alteraciones en el crecimiento del feto (Coustán, 2017); periodontitis (Ziukaite y cols, 2017) y pie diabético (McClennon, 2017).

Concretamente las complicaciones micro y macrovasculares son las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM. Se ha descrito que los sujetos con DM1 son propensos a la aterosclerosis acelerada y tienen de 3 a 6 veces más riesgo de muerte cardiovascular que los individuos sin diabetes (Bertoluci y cols, 2015). Además, es imprescindible mencionar que actualmente se le considera a la disfunción endotelial como como un factor común y determinante en el desarrollo de las complicaciones propias de la DM (Ferreira y cols, 2017).

La disfunción endotelial es un evento temprano respecto al inicio de la diabetes que puede ser independiente de los factores clásicos de riesgo cardiovascular como la hiperglucemia y aumento de la lipemia. Además curiosamente, estos factores de riesgo cardiovascular en conjunto no pueden explicar la totalidad del riesgo cardiovascular durante la diabetes (Cé y cols, 2011). La hiperglucemia crónica aunque es un importante predictor de la enfermedad microvascular, a su vez es un débil predictor de las complicaciones macrovasculares diabéticas. Por lo tanto, gran parte del riesgo cardiovascular residual sigue sin explicarse. Por lo que bajo este contexto la disfunción endotelial se convierte en un nuevo factor de riesgo importante en el escenario cardiovascular (Ceriello y cols, 2012).

#### **1.1.2.1. Cambios estructurales del endotelio**

Evidencias experimentales y clínicas han demostrado que la hiperglucemia crónica sostenida en la diabetes promueve importantes modificaciones estructurales y funcionales en el endotelio

(Hadcock y cols, 1991; Rosenstock y cols, 1988). En la aorta de conejos con diabetes inducida por aloxano, los cambios endoteliales son visibles después de 2 semanas desde el inicio de la hiperglucemia y se vuelven más graves después de 6 semanas de inicio (Hadcock y cols, 1991). En ratones, 6 semanas después de la aparición de la diabetes inducida por la estreptozotocina (STZ), es posible observar una mayor permeabilidad endotelial y la apoptosis de células endoteliales (Lin y cols, 1993).

En pacientes humanos se reportó que la diabetes genera aumento de la membrana basal respecto a sujetos no diabéticos (Bertoluci y cols, 2015), y en estudios de microscopía electrónica se describió que las células endoteliales obtenidas de sangre de cordón umbilical de mujeres embarazadas con DM1 muestran un aumento del área mitocondrial en comparación con las mujeres embarazadas sin diabetes. La hiperglucemia induce un exceso de electrones que se escapan de la cadena oxidativa y son capturados por el oxígeno, generando un exceso de O<sup>-</sup> y el estrés oxidativo (Rosenstock y cols, 1988). Es decir, se genera disfunción endotelial (DE), que es una desregulación entre los factores vasoconstrictores liberados por el endotelio en comparación con la disminución de los factores vasodilatadores debido a la disminución de la biodisponibilidad de NO (Pomilio y cols, 2002).

Además, dicha DE conduce a una migración de las células sanguíneas hacia la pared arterial, induciendo proliferación de células de músculo liso (Villegas y cols, 2014), agregación plaquetaria, oxidación de LDL, adhesión de monocitos y síntesis de citocinas inflamatorias, de esta manera se explica la participación de factores que contribuyen a la aterogénesis (Vita y cols, 2002). La DE es un factor común en los diferentes tipos de DM. Además, el grado de

glucemia y la duración de la diabetes se correlaciona inversamente con la dilatación dependiente de endotelio (Singh y cols, 2003).

### **1.1.2.2. Mecanismos de disfunción endotelial**

#### **1.1.2.2.1. Estrés oxidativo**

Durante la DM se genera aumento del estatus oxidativo, así como reducción en la defensa antioxidante en comparación con sujetos sanos (Varvarovská y cols, 2004). La hiperglucemia puede causar una producción excesiva de  $O_2^-$  en la cadena oxidativa de las mitocondrias de las células endoteliales. El exceso de  $O_2^-$  reacciona rápidamente con NO, reduciendo la biodisponibilidad del NO y produciendo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que es un potente agente oxidante y un activador de la peroxidación lipídica que puede afectar la función endotelial al estimular el metabolismo del ácido araquidónico y producir aumento de los agentes vasocontráctiles endoteliales (Kojda y Harrison, 1999). La sobreproducción de  $O_2^-$  y NO favorece la formación de peroxinitrito interfiriendo con la producción del cofactor de la enzima NO sintasa endotelial (eNOS), la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) (Francis y cols, 2017).

La eNOS es una enzima conformada por tres dominios globulares (Feng y cols, 2012), que se vuelve disfuncional a causa de la oxidación del cofactor  $BH_4$  en dihidrobiopterina ( $BH_2$ ), y la oxidación de su núcleo  $ZnS_4$  (Zou y cols, 2002). El desacople enzimático de la eNOS en el endotelio la convierte en una enzima disfuncional que promueve un cambio parcial de función entre la producción de NO a la producción de  $O_2^-$  (Guzik y cols, 2002). La NADPH oxidasa es una enzima determinante en la producción de  $O_2^-$  en modelos animales de enfermedades vasculares, incluida la diabetes (Mahmud y cols, 2006).

### 1.1.2.2.2. Activación de la vía de la proteína cinasa C

La proteína cinasa C (PKC) es una familia de proteínas cinasas conformada por al menos 10 isoformas (Mellor y Parker, 1998). Basado en el segundo mensajero que requieren, se clasifican en tres subfamilias: convencional, nuevo y atípico (Nishizuka, 1995). Las PKCs convencionales contienen las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ <sub>I</sub>,  $\beta$ <sub>II</sub>, y  $\gamma$ , que requieren  $\text{Ca}^{2+}$ , diacilglicerol (DAG), y un fosfolípido como fosfatidilserina para su activación. Las PKCs nuevas (nPKCs) incluyen las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , y  $\theta$ , y requieren DAG, pero no  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación. En consecuencia, las PKCs convencionales y nuevas son activadas a través de la misma ruta de transducción de señales: la fosfolipasa C. Por otro lado, las PKCs atípicas (aPKCs) (incluyendo la proteína quinasa M $\zeta$  y las isoformas  $\iota$  /  $\lambda$ ) no requieren  $\text{Ca}^{2+}$  ni DAG para su activación (Sajan y cols, 2017).

Por lo tanto la PKC es una familia citoplasmática de enzimas con una amplia variedad de acciones en la transducción de señales intracelulares. La activación de la PKC a nivel vascular disminuye la síntesis de NO derivada del endotelio, mientras que su inhibición aumenta la liberación de este potente vasodilatador. Las isoformas beta se activan en respuesta a la hiperglucemia (Inoguchi y cols, 1992), indicando que el sistema PKC- $\beta$  es un importante regulador de la función endotelial inducida por hiperglucemia.

Existen varios mecanismos en los que la PKC puede disminuir la biodisponibilidad del NO, por ejemplo, la PKC antagoniza la activación de la eNOS, disminuyendo la concentración de NO, e induce la activación de la NADPH oxidasa para producir O $\cdot$ -, que, a su vez, desacopla a la eNOS, induciendo aún más la producción de O $\cdot$ -. La PKC está asociada con diversos

trastornos vasculares tales como la disminución de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, aumento de la matriz extracelular, aumento de la permeabilidad vascular, contractilidad y proliferación celular (Bertoluci y cols, 2015), mecanismos involucrados en la génesis y desarrollo de complicaciones vasculares durante la DM.

#### **1.1.2.2.3. Productos de glicación avanzada**

En presencia de hiperglucemia sostenida, las proteínas tisulares como el colágeno experimentan una glicosilación no enzimática y la formación de enlaces cruzados dando lugar a productos finales de glicación avanzada (AGE), los cuales provocan una modificación química permanente de las proteínas, estimulando las respuestas celulares a través de determinados receptores anti-proliferativos y mostrando la capacidad celular de eliminar las proteínas glicosiladas modificadas. Los AGEs pueden reducir la disponibilidad de NO endotelial, y a nivel citoplasmático los intermedios AGE reactivos pueden comprometer su efecto antiproliferativo (Bertoluci y cols, 2015), generando de esta manera descompensación tanto de la célula endotelial como de sus agentes vasoreguladores.

#### **1.1.2.2.4. Activación de la vía del poliol**

La hiperglucemia crónica aumenta la actividad de la enzima aldosa reductasa debido a que la glucosa es uno de sus principales sustratos que en presencia de NADPH conduce a la activación de la vía del poliol, transformando la glucosa en sorbitol que a su vez es transformado en fructosa por la sorbitol deshidrogenasa. El sorbitol no difunde fácilmente a través de la membrana celular, por lo que puede acumularse ocasionando daños osmóticos e hinchamiento celular. Por otra parte, la activación de esta vía también induce el consumo de NADPH, un cofactor importante para la síntesis de NO (Guzik y cols, 2002). Como el NADPH

es un cofactor importante para la NOS en la síntesis de NO, su agotamiento generado por activación de los polioles conduce a la reducción de la producción de NO (Piatti y cols, 2013).

## **1.2. Hipertensión arterial pulmonar**

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad incurable y con un pronóstico de vida de 2 a 3 años. La HAP se define por valores en reposo de la presión arterial pulmonar media (PAPm)  $> 25$  mmHg (5° Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar, 2013), valores de presión pre-capilar  $> 15$  mmHg y valores de presión de enclavamiento pulmonar  $\leq 15$  mmHg (Von Siebenthal y cols, 2016). La HAP se caracteriza por tener como principales manifestaciones clínicas a la disnea, presencia de debilidad, fatiga, soplos de insuficiencia pulmonar, cianosis y síncope (Galié y cols, 2016).

Actualmente, se emplean distintas técnicas como la ecocardiografía, la resonancia magnética nuclear, que evalúa cambios morfo-funcionales del ventrículo derecho (VD) y la tomografía por emisión de positrón o tomografía computarizada que evidencian la presencia de metabolitos anormales. Sin embargo, a pesar de la incursión de este grupo de técnicas es el cateterismo cardiaco derecho (CCD) es la única técnica aprobada para el diagnóstico de HAP; por lo que, se le considera la prueba de oro junto con la prueba de la caminata de los seis minutos a velocidad constante. Esta última prueba además se relaciona con la calidad de vida y la supervivencia, pues evalúa parámetros como la disnea y los niveles de cansancio durante y al final de la prueba tomando como referencia la escala de Borg (Von Siebenthal y cols, 2016), que es una herramienta utilizada para evaluar el esfuerzo de un individuo percibido con un valor numérico que va del 0 al 10.

La HAP se caracteriza por el desarrollo de fibrosis vascular a nivel arterial pulmonar y cardiaco, hipertrófia de la capa vascular media, cambios proliferativos en la capa vascular íntima así como un engrosamiento de la capa adventicia provocando el aumento de la resistencia vascular pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, hipoxia, disfunción endotelial, inflamación, desequilibrio de vasoactivos y de mediadores proliferativos y muerte prematura (Rameh y Kossaify, 2016). Los pacientes que cursan con un cuadro de HAP independientemente de su origen desarrollan las características antes mencionadas y tienen en mayor o menor medida signos como la alteración en la capacidad de ejercicio, insuficiencia ventricular derecha, disnea, angina de pecho, edemas periféricos y tos (Von Siebenthal y cols, 2016; Rameh y Kossaify, 2016).

### **1.2.1. Clasificación de la hipertensión arterial pulmonar**

A la fecha, la etiología de la HAP no es del todo conocida; sin embargo, a partir del 2008 (Dana Point Classification, 2008) esta patología se clasifica en 5 grupos de acuerdo al origen de la enfermedad (esta clasificación también es utilizada por la organización mundial de la salud). En el 2013, durante el consenso de Niza, la clasificación sufrió ligeros cambios (tabla 1) quedando de la siguiente manera: en el grupo número I se ubica a aquella hipertensión pulmonar de origen idiopático, hereditable, inducida por drogas, por el cierre de arteriolas, por la proliferación de las células del músculo liso vascular (CMLV), por alteraciones genotípicas y las diferentes formas de HAP incluyendo la persistente del recién nacido; en el número II se encuentran las originadas por la hipertensión venosa pulmonar, disfunción sistólica, diastólica y enfermedades relacionadas al corazón izquierdo; en el número III se clasifican aquellas que se originan por hipoxia crónica y enfermedades pulmonares; en el grupo IV las generadas por enfermedad tromboembólica y el grupo V es de origen multifactorial como es el caso de



factores parasitológicos, hematológicos, metabólicos, alteraciones en el almacenamiento de glucógeno y fallas crónicas renales (Von Siebenthal y cols, 2016; Grinnan y cols, 2016). Sin embargo, hay mecanismos que conllevan al desarrollo de esta enfermedad que no se pueden catalogar en ninguno de estos grupos como es el caso de la DM.

<b>Grupo</b>	<b>Características</b>
I	Hipertensión arterial pulmonar (HAP) y la asociada a compromiso venoso o capilar significativo.
II	Hipertensión pulmonar debida a enfermedad cardíaca izquierda.
III	Hipertensión pulmonar debida a enfermedad pulmonar y/o hipoxia.
IV	Hipertensión pulmonar debida a trombo embolismo pulmonar crónico.
V	Hipertensión pulmonar de mecanismos inciertos o multifactoriales.

**Tabla 1. Clasificación de la hipertensión pulmonar.** Se muestran los 5 grupos de la propuesta presentada en el «5º Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar» en Niza, Francia. (Modificada de Álvez y cols, 2017).

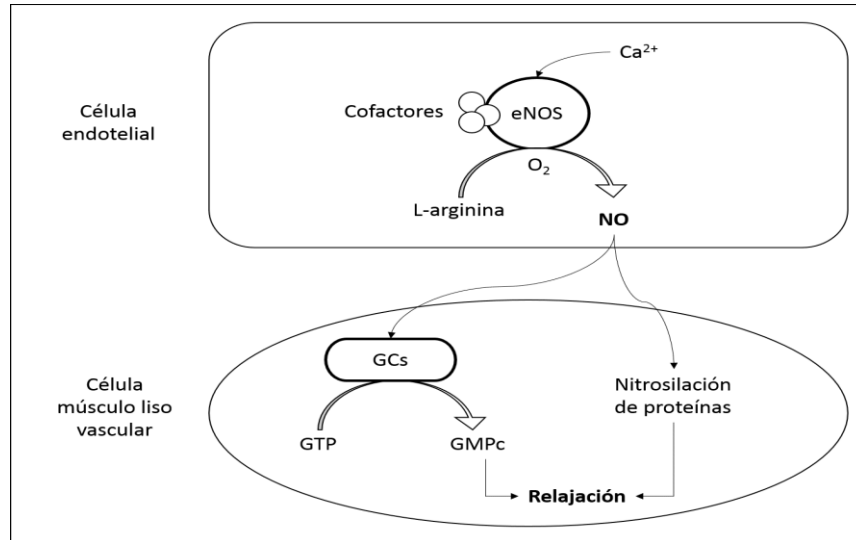
## **1.2.2. Factores que participan en la contracción del músculo liso vascular de arterias pulmonares**

### **1.2.2.1. El endotelio**

#### **1.2.2.1.1. El óxido nítrico**

El NO es un gas biológicamente activo el cual se le han atribuido diferentes funciones. Además, fallos en su síntesis, liberación o biodisponibilidad pueden dar lugar a problemas cardiovasculares. A nivel de la pared vascular, el NO induce vasodilatación, inhibición de la migración celular e inhibición de la agregación plaquetaria (Singh y Evans, 1997; Jong y cols, 2016). El NO se sintetiza a partir del aminoácido básico L-arginina y la actuación de la NO sintasa (NOS) en presencia de oxígeno, así como también con la presencia de cofactores como la BH<sub>4</sub>, dinucleótido de adenina y flavina, mononucleótido de flavina, dinucleótido de nicotinamida, adenina monofosfato y calcio (Antosova y cols, 2017). Se han descrito tres

isoformas de NOS, la NOS-1 o nNOS que se expresa principalmente a nivel neural, la NOS-2 o iNOS, que su expresión es inducida por citoquinas y endotoxinas en diferentes tipos de tejidos y la NOS-3 o eNOS que se expresa principalmente en el endotelio. El NO producido por la eNOS participa en el mantenimiento del tono vascular por medio de la activación de la GCs y el consecuente incremento del GMPc, o bien mediante la nitrosilación de proteínas (Hobbs e Ignarro, 1996; Zhao y cols, 2015) (Figura 1). Se ha descrito en modelos animales y en pacientes que la disminución de la producción o biodisponibilidad de NO a nivel pulmonar puede contribuir al desarrollo de HAP (Villamor y cols, 1997; Zhang y cols, 2016).



**Figura 1. Vía de señalización del óxido nítrico vascular.** Se muestra la síntesis del NO en el endotelio y el mecanismo mediante el cual el NO induce vasodilatación en células de músculo liso vascular. Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio, eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, NO: Óxido nítrico, GCs: Guanilato ciclasa soluble, GTP: Guanosil trifosfato, GMPc: Guanosil monofosfato cíclico (modificado de Kelvin, 2015).

#### 1.2.2.1.1. Estrés oxidativo

Hoy en día está absolutamente claro que los radicales libres son participantes activos en diversos procesos fisiológicos, por lo que no pueden ser considerados más como solamente agentes dañinos, sino como participantes activos en muchas funciones normales de los organismos pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular

y/o actuando como mediadores para la activación de las células (Lushchak, 2014; Herrera y cols, 2001). Por lo tanto en condiciones fisiológicas, las EROS son sintetizadas en bajas concentraciones, y juegan un papel fisiológico importante en el mantenimiento de la integridad cardiovascular, mientras que los niveles elevados de EROS han demostrado tener un papel fisiopatológico en la disfunción y remodelado cardiovascular, así como en enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Sato y cols, 2011). Además, las EROS pueden inhibir a las enzimas antioxidantes o activar otras fuentes productoras de estrés oxidativo (Faraci y Didion, 2004), produciendo una mayor concentración de EROS, lo que se puede traducir como una disminución de la biodisponibilidad del NO endotelial o disfunción endotelial, disminuyendo la capacidad relajante dependiente del endotelio.

Las especies reactivas de oxígeno son sustancias oxigenadas de alta reactividad con otras biomoléculas, debido a que se caracterizan por presentar uno o más electrones impares (radicales libres), aunque también se pueden presentar como especies no radicales. En paralelo a estas especies el término especies reactivas de nitrógeno es utilizado para identificar sustancias reactivas que contienen nitrógeno.

Las EROS involucradas en las vías de señalización son el O.- y el peróxido de hidrógeno. El O.- se encuentra eléctricamente cargado, lo que lo vuelve altamente reactivo y en condiciones fisiológicas basales es rápidamente dismutado en peróxido de hidrógeno; su difusión es limitada y se encuentra en el orden de picomolar-nanomolar. En contraste el peróxido de hidrógeno es menos reactivo y su concentración se encuentra entre los nanomolar-micromolar y respecto al O.- difunde mucho mejor a través de las membranas hidrofóbicas (Schröder y Eaton, 2008).

### **1.2.2.1.2. La endotelina**

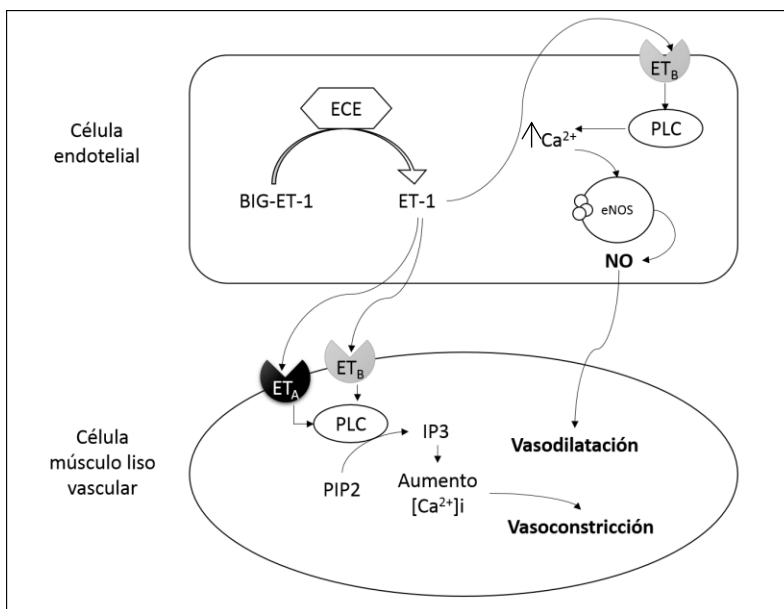
La endotelina (ET) es un péptido liberado por el endotelio y actúa como un potente vasoconstrictor, por lo que su principal efecto ocurre sobre el tono vascular vía receptores tipo A de endotelina (ET<sub>A</sub>) acoplados a proteínas G; aunque también puede producir liberación de vasodilatadores del endotelio por medio del receptor tipo B de endotelina (ET<sub>B</sub>). Aunque existen tres isoformas de la ET (ET-1, ET-2, ET-3). A la ET-1 se le atribuye el desarrollo de patologías cardiovasculares (Sauvageau y cols, 2007), puesto que se ha referido que la ET-1 genera remodelación vascular (Rodríguez-Vita y cols, 2005), producción de factores de crecimiento (Xiang y cols, 1996) y la formación de EROS (Yuhki y cols, 2001).

El gen ET-1 humano codifica la Preproendotelina de 212 aminoácidos, esta proteína sufre una proteólisis por acción de una endopeptidasa que da origen a la Big-endotelina-1 de 39 aminoácidos (Big-ET-1) (Prasad y cols, 2009). Este fragmento posteriormente sufre la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE-1) de las que existen cuatro isoformas (a, b, c, d). Fundamentalmente hay dos isoformas que intervienen en la proteólisis de Big-ET-1; la isoforma ECE-1a es expresada en el aparato Golgi de las células que producen endotelina, las células endoteliales poseen esta isoforma que tiene como sustrato a la Big-ET-1 intracelular (Kedzierski y Yanagisawa, 2001). También se debe señalar que estas mismas células endoteliales poseen la isoforma ECE1b, la que está localizada en la membrana celular y su sustrato es la Big-ET-1 extracelular (Masaki, 2004). La enzima convertidora de endotelina (ECE), es una metaloendoproteinasa, la cual rompe la unión en la posición triptófano 21-valina 22 (Trp21-Val22), transformando la Big-ET-1 en ET-1 de 21 aminoácidos (ET-1), siendo éste el péptido activo (Scheider y cols, 2007).

La ET-1 se une a su receptor específico ET<sub>A</sub> de la célula del músculo liso vascular unido a una proteína Gq activando a la fosfolipasa C. Esta activación induce hidrólisis de los lípidos de inositol localizados en la membrana, formando dos segundos mensajeros, IP3 y DAG (La y Reid, 1995). El IP3 hace contacto con su receptor en la superficie del retículo sarcoplásmico (RS) favoreciendo la liberación del Ca<sup>2+</sup> del mismo hacia el citosol favoreciendo la vasoconstricción. Al mismo tiempo, el DAG activa la proteína cinasa C, incrementando la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio. Además, ésta última fosforila a las cadenas ligeras de miosina para iniciar la contracción de la fibra muscular lisa. Otra función que se asocia a la PKC, es la activación de la compuerta Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, aumentando finalmente la entrada de calcio a la célula del músculo liso (Kurtel, Ghandour, 1999).

Los receptores ET<sub>B</sub> son acoplados a Gq/G11 y su posterior activación recluta vías dependientes de fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>), fosfolipasa D (PLD), Intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y adenilato y guanilato ciclasa. La movilización de calcio intracelular y la entrada del mismo a la célula, así como las vías de señalización dependientes de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la subunidad β/γ de la proteína G, se producen posterior a la interacción de ET-1 y ET<sub>B</sub> (Comellas y Briva, 2009). Cuando ET-1 entre en contacto con el receptor ET<sub>B</sub> a nivel de las células endoteliales produce relajación del endotelio a expensas del incremento de GMPc. Esto produce la liberación del NO y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Por lo tanto, este receptor permite modular la respuesta vasoconstrictora de ET-1 (Radomski, 2003), generando un efecto autoregulatorio (Figura 2).

La expresión de ET-1 aumenta cuando las arterias pulmonares (AP) se encuentran en condiciones de hipoxia, este efecto se observa en modelos animales de HP (Frasch y cols, 1999) y en pacientes con HP (Giaid y cols, 1995).



**Figura 2. Vía de señalización de la endotelina 1.** Mecanismo mediante el cual la endotelina-1 genera tanto vasoconstricción como vasodilatación en células de músculo liso vascular. ECE: Enzima convertidora de la endotelina, BIG-ET-1: Big endotelina 1, ET-1: Endotelina 1, ET<sub>B</sub>: Receptor a endotelina tipo B, ET<sub>A</sub>: Receptor a endotelina tipo A, PLC: Fosfolipasa C, Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio, eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, NO: Óxido nítrico, PIP<sub>2</sub>: Fosfoinositol 2 fosfato, IP<sub>3</sub>: Inositol 3 fosfato, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Concentración intracelular del ion calcio (modificado de La y Reid, 1995).

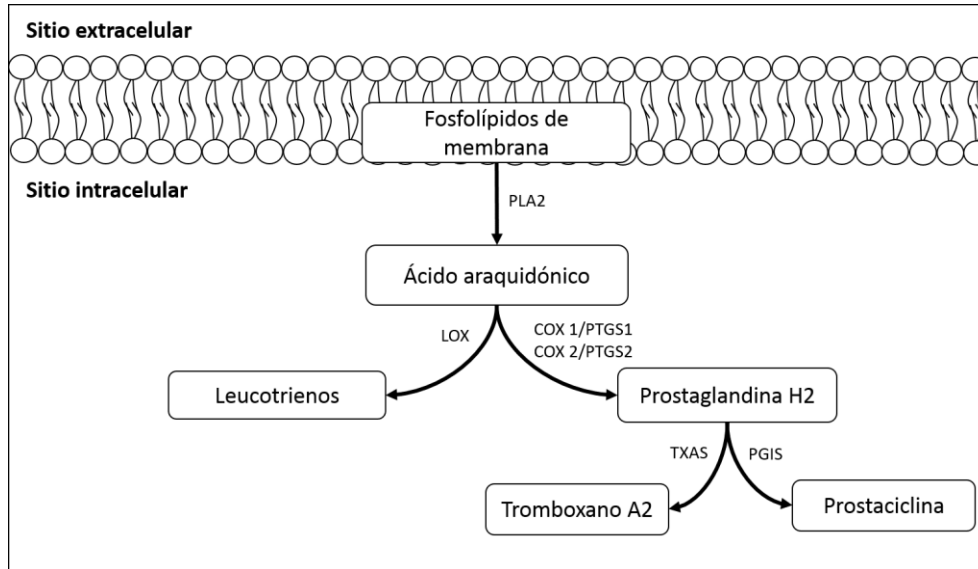
### 1.2.2.1.3. Los prostanoides

Los prostanoides son sintetizados en casi todas las células y su liberación depende del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, del contenido celular de la ciclooxigenasa (COX) y de la expresión relativa en cada tipo celular de las enzimas que metabolizan la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) y tromboxanos (TX) (Ichinose y cols, 2002; Smyth y cols, 2009) (Figura 3). Existen dos isoformas de la COX; la COX-1 es generalmente activa de forma constitutiva participando en la regulación homeostática, mientras que la COX-2 es inducida por estímulos como son: los mediadores inflamatorios, citocinas, 5-HT, factores de crecimientos, estrés oxidativo y estrés mecánico (Patrono, 2016).

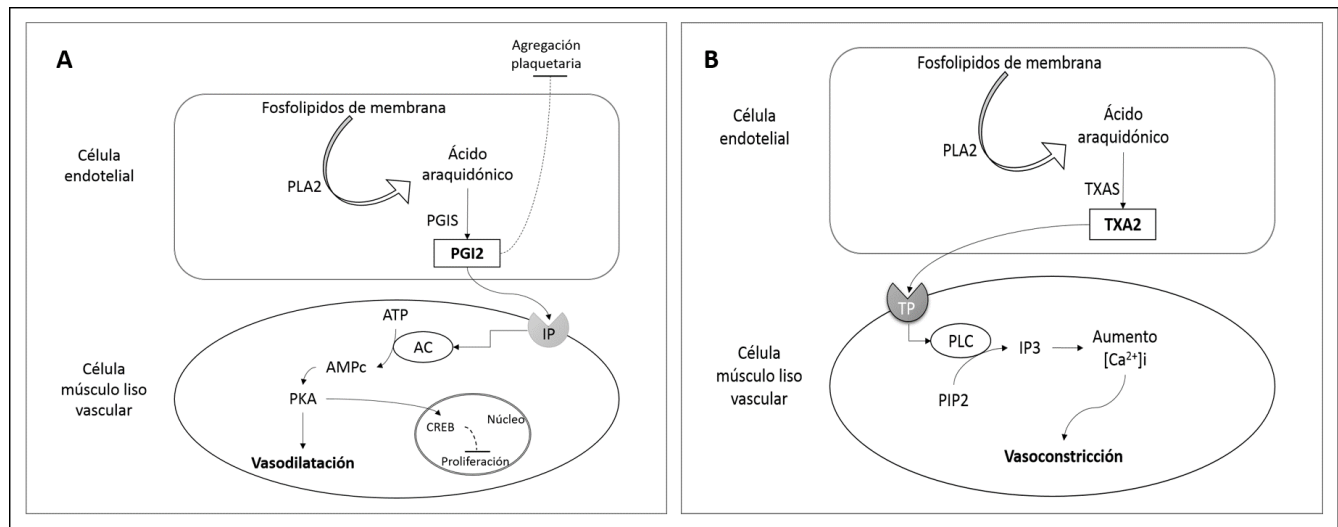
La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es sintetizada en las células endoteliales a través de la activación de la PGI<sub>2</sub> sintasa (PTGS<sub>2</sub>); es un inhibidor de la agregación plaquetaria y de la proliferación de las CMLV *in vitro* por activación de CREB u otros factores de transcripción a nivel nuclear (Majed y Khalil, 2012), así como también un mediador antitrombótico *in vivo* (Kobayashi y cols, 2004). La PGI<sub>2</sub> se une a su receptor (IP) en la membrana de la CMLV, el cual se encuentra acoplado a una proteína G que a su vez activa a la enzima adenilato ciclasa (AC) para la formación de AMPc a partir de ATP en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Río abajo en la vía de señalización se activa a la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (CLMP) generando la disociación del puente cruzado miosina-actina, además de disminuir la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca<sup>2+</sup>, por lo que, se le considera un potente vasodilatador (Majed y Khalil, 2012) (Figura 4a). En este tenor se ha reportado que pacientes con HP tienen niveles bajos de este prostagnoide (Clapp y Gurung, 2015), y un estudio ha demostrado que agonistas de su receptor disminuyen los efectos de la hipertensión pulmonar (Lang y Gaine, 2017).

El tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) produce vasoconstricción y desempeña un papel muy importante en el control del tono vascular (Weksler cols, 2015), además contribuyen al desarrollo de complicaciones vasculares durante la diabetes (Pedersen y cols, 2001). El receptor a TXA<sub>2</sub> (TP) se encuentra acoplado a la proteína G<sub>q</sub> activadora de la PLC que a través del IP<sub>3</sub> generará la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS permitiendo la formación del puente cruzado entre miosina y actina para generar contracción muscular (Majed y Khalil, 2012) (Figura 4b). Alteraciones en sus niveles se han implicado en la génesis de diversas formas de HP (Farber y Loscalzo, 2004). Así mismo, se ha descrito que durante la HP existe una elevada producción

de TXA2 y aumento de la activación (Liu y cols, 1994) y/o alteraciones en la densidad de los receptores a tromboxano (West y cols, 2016).



**Figura 3. Mecanismo general de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.** En casi todos los tipos celulares se realiza la liberación del ácido araquidónico por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2) sobre los fosfolípidos de membrana y algunos de los productos que resultan de su metabolismo son el tromboxano A2 y las prostacilinas. LOX: Lipooxigenasa, COX: Ciclooxygenasa, PTGS: Sintasa de la prostaciclina, PGIS Sintasa de la prostaciclina, TXAS: Tromboxano sintasa (modificado de Murray y cols, 2007).



**Figura 4. Vía de señalización del TXA2 y de la PGI2.** A: Muestra la síntesis de la prostaciclina y señala sus principales mecanismos efectores (vasodilatación, inhibición plaquetaria e inhibición de la proliferación de las CMLV). B: Muestra la vía de señalización de la síntesis del TXA2 y su mecanismo vasoconstrictor. IP: Receptor de prostaglandinas, TP: Receptor a tromboxano, PTGS: Sintasa de la prostaglandina, PGIS Sintasa de la prostaciclina, PGI2: Prostaglandina I2, TXAS: Tromboxano sintasa. TXA2: Tromboxano A2, AC: Adenilato cilasa, PKA: Proteína cinasa A (modificado de Murray y cols, 2007).



## **1.2.2.2. La capa muscular.**

### **1.2.2.2.1. La Serotonina**

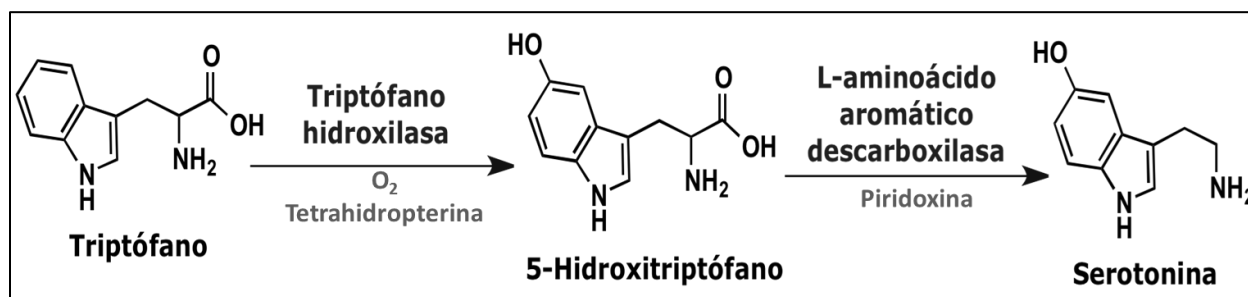
La serotonina es un mensajero bioquímico que se encuentra distribuido a través del sistema nervioso y órganos periféricos (Bertrand y cols, 2010). Se encuentra libre en plasma a concentraciones menores a 1 nM, es sintetizada principalmente en las células enterocromoafines que recubren el intestino, y es almacenada en sus gránulos secretores por acción de los monoamino transportadores vesiculares (Bertrand y cols, 2010); aunque también es sintetizada en las células endoteliales de las arterias pulmonares (MacLean y cols., 2000, Eddahibi y cols, 2001). La síntesis de la 5-HT se realiza en dos pasos; el primer paso es la hidroxilación del aminoácido esencial L-Triptófano (Trp) que casi en su totalidad proviene de la dieta; es biotransformado a L-5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) en presencia de los cofactores BH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub> (Welford y cols, 2016). Esta enzima tiene dos isoformas, la TPH1 que se encuentra expresada a nivel periférico, mientras que la TPH2 se encuentra a nivel del sistema nervioso central (Walther y cols, 2003). Posteriormente, en el segundo paso la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa que pertenece a la familia de las enzimas L-d Descarboxilasas de aminoácidos aromáticos (AADC) cataliza la formación de la 5-hidroxitriptamina en presencia de piridoxina (Vitamina B6) (Hilal-Dandan y Laurence L Brutom, 2012; Welford y cols, 2016) (figura 5). Incrementos en la TPH1 se han relacionado con un aumento de la probabilidad de desarrollar enfermedades periféricas como fibrosis pulmonar (Fabre y cols, 2008) e HP (Morecroft y cols, 2007).

A nivel cardiovascular, el principal reservorio de la 5-HT son las plaquetas circulantes, las cuales contienen más del 99% de la serotonina en sangre. La 5-HT puede liberarse hacia el espacio extra celular ya sea a través de sus receptores o por mecanismos de recaptación en

células que expresan los transportadores de serotonina (5-HTT), tales como las células del músculo liso, epiteliales y plaquetas.

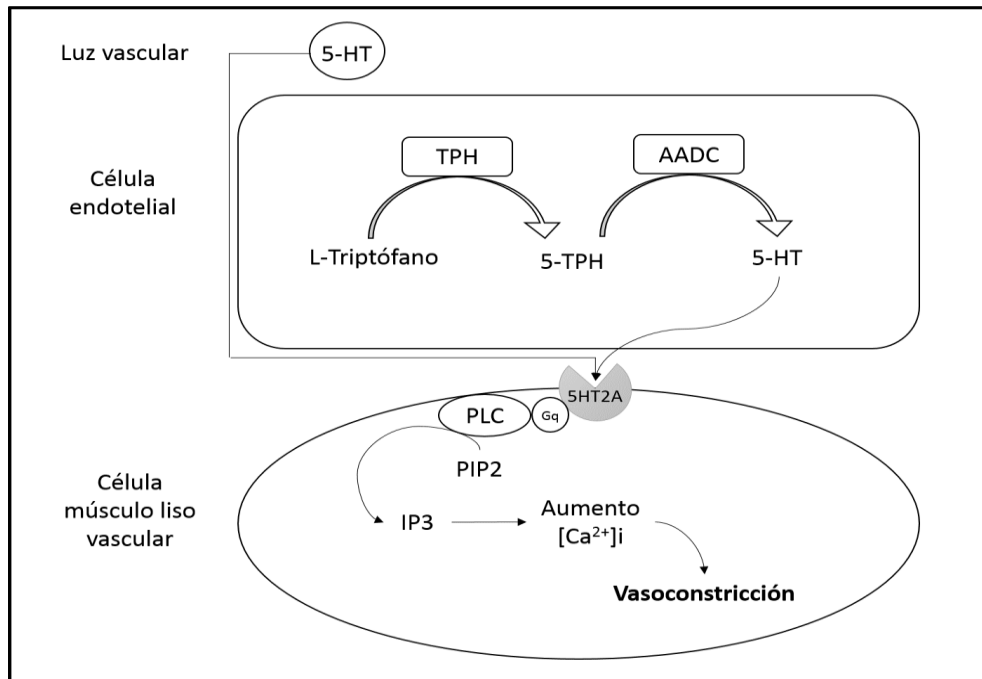
Se han propuesto 14 receptores de 5-HT divididos en 7 familias (5-HT1-7), de los cuales los 5-HT1B se localizan en arterias pulmonares de humano en la capa muscular y principales efectores para generar vasoconstricción (MacLean y cols, 1996, Morecroft y cols, 1999). Los 5-HT<sub>2A</sub> se encuentran en las arterias pulmonares de ratas (Cogolludo y cols, 2006) y los 5-HT<sub>2B</sub> presentes en las arterias pulmonares de ratones; sin embargo, no son los únicos a través de los cuales se regula la presión arterial en las diferentes especies, ya que se ha reportado que la serotonina puede actuar tanto para generar vasoconstricción como vasodilatación causando un efecto de balanceo entre estos dos mecanismos (Barnes y Liu, 1995).

La 5-HT actúa estimulando procesos proliferativos en la pared vascular y es un potente vasoconstrictor (Eddahibi y cols, 2006) debido a que los receptores a 5-HT se encuentran acoplados a proteínas G, que activan vías de señalización intracelular echando a andar mecanismos mediante los cuales se favorece la vasoconstricción. En pacientes con hipertensión pulmonar se ha encontrado un aumento de la expresión de la enzima TPH en las células endoteliales pulmonares (Eddahibi y cols, 2006) y niveles elevados de 5-HT (Herve y cols, 1995). En modelos animales, el tratamiento con inhibidores de los receptores de 5-HT y de su transportador reduce el desarrollo de HP (Hironaka y cols, 2003). A nivel intracelular, la 5-HT activa mecanismos de sensibilización al calcio como parte del mecanismo vasoconstrictor (Liu y cols, 2004).

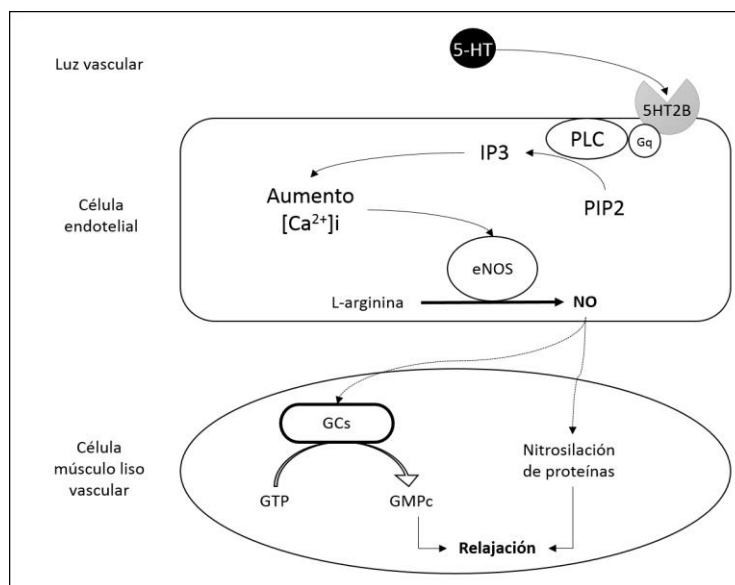


**Figura 5. Síntesis de la serotonina.** Muestra como la enzima triptófano hidroxilasa en presencia de oxígeno y tetrahidropterina genera la hidroxilación del anillo aromático del triptófano y posteriormente la descarboxilasa aromática en presencia de piridoxina elimina al ácido carboxílico del 5-hidroxitriptófano para llevar a cabo la síntesis de la serotonina (modificado de Chugani, 2011).

El receptor 5-HT<sub>2A</sub> es uno de los principales involucrados en el desarrollo de la HAP, pues se encuentra altamente expresado en las CMLV de la arteria pulmonar, esto aunado a la alta secreción de 5-HT dependiente de neuronas o plaquetas a nivel pulmonar durante la HAP aumenta el tono vascular (Figura 6), también se ha demostrado que este receptor induce proliferación vía fosfatidilcolina específica de fosfolipasa C mitogénica activadora de proteínas cinasas (MacLean y cols, 2000). El receptor 5-HT<sub>2B</sub> se encuentra acoplado a una proteína Gq favoreciendo el aumento de la concentración intracelular de calcio y por lo tanto activación de la eNOS favoreciendo la síntesis de NO y subsecuentemente desencadenando la vía de señalización a nivel de las CMLV para favorecer relajación muscular (Watts and Davis, 2011) (figura 7).



**Figura 6. Mecanismo contráctil de la serotonina.** Tanto la serotonina (5-HT) circulante como la sintetizada en las células endoteliales tienen la probabilidad de unirse al receptor a serotonina (5-HT<sub>2A</sub>) como principal mecanismo de acción mediante el cual esta sustancia induce aumento del tono vascular. PLC: Fosfolipasa C, Gq: Proteína Gq, TPH: Enzima triptófano hidroxilasa, 5-TPH: 5-hidroxi triptófano, AADC: L-descarboxilasas de aminoácidos aromáticos (modificado de Pai y Marshall, 2011).



**Figura 7. Vasodilatación inducida por serotonina.** La serotonina (5-HT) circulante puede unirse a los receptores endoteliales 5HT<sub>2B</sub> e inducir el aumento de la concentración intracelular de calcio, lo que favorece la activación de la eNOS y consiguiente producción de óxido nítrico (NO) que posterior a su difusión inducirá relajación de las células de músculo liso vascular (modificado de Alberts y cols, 2002).

#### 1.2.2.2.2. La angiotensina II

En condiciones fisiológicas, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempeña un importante papel en la regulación de la presión arterial y de la homeostasis hidrosalina. En condiciones patológicas, la activación del SRAA y el aumento de los valores tisulares de angiotensina II (A-II) participan en la génesis de numerosos procesos cardiovasculares que aumentan la morbimortalidad del paciente, tales como la hipertensión arterial, la hipertrofia cardíaca, el remodelado cardiovascular, la nefropatía diabética, la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardíaca y renal (Tamargo, 2000; Griendling y cols, 1996). Existen 2 tipos de receptores celulares a A-II, denominados AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (Tamargo y cols, 2006). Durante la etapa adulta los receptores AT<sub>1</sub> se distribuyen por todos los tejidos, pero se encuentra una mayor densidad de estos en el corazón, en los vasos sanguíneos, en el riñón, el endotelio y en el sistema nervioso central. Por su parte, los AT<sub>2</sub>, predominan en los tejidos fetales y disminuyen tras el nacimiento, por lo que en el adulto sano se encuentran en pequeñas cantidades en todos los tejidos (De Gasparo y cols, 2000).

A nivel vascular, la A-II es el principal péptido vasoactivo del RAAS; regula una gran variedad de procesos fisiopatológicos como la hipertensión arterial, la hiperproliferación de las células músculo liso vasculares y su hipertrofia (Atef y Anand-Srivastava 2014), esto debido a la activación de varios mecanismos de señalización intracelular entre los cuales se incluyen adenilato ciclasa-AMPC, fosfatidil inositido 3-cinasa, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías de tirosina cinasa (Gusan y Anand-Srivastava 2013; Hossain y Anand-Srivastava, 2017). A través de la activación de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> es como se desencadenan las señales moleculares de manera intracelular; pero la mayoría de los efectos

fisiopatológicos de A-II están mediados por la activación de receptores AT<sub>1</sub> (Hossain y Anand-Srivastava, 2017).

Se ha demostrado un aumento en el efecto de la A-II, proporcional al aumento del estrés oxidativo debido a la producción de EROS a través de la activación de la NADPH oxidasa (Seshiah y cols, 2002). Las EROS a través de la activación de varias cinasas como la MAPK y la serina/treonina cinasa Akt (PKB) río abajo en la vía de señalización intracelular, están implicadas en la hipertrofia de CMLV inducida por A-II (Ushio-Fukai y cols, 1999). También se ha reportado que niveles elevados de A-II endógena en CMLV de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a través del estrés oxidativo, favorece la transactivación de los receptores del factor de crecimiento tales como: el receptor al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-R), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), así como el aumento en la señalización mediada por MAPK, contribuyen a la hipertrofia de las CMLV (Atef y Anand-Srivastava 2016).

#### **1.2.2.2.3. Canales de potasio y calcio**

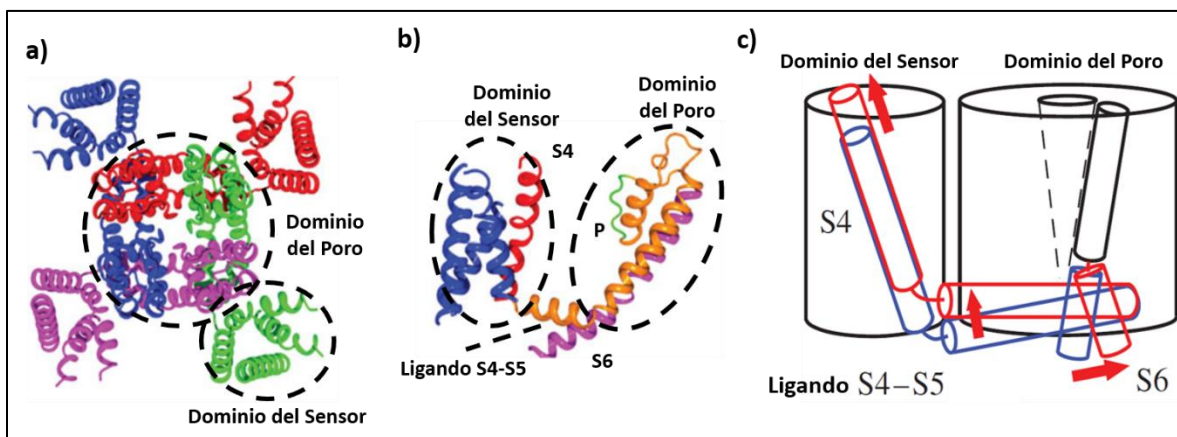
Los canales de potasio son heterotetrámeros u homotetrámeros, compuestos de 4 subunidades  $\alpha$  que forman el poro del canal, asociadas con 4 subunidades reguladoras  $\beta$ . Actualmente, se han descrito cinco tipos de canales de potasio en las células musculares de la pared vascular; los activados por voltaje o K<sub>V</sub>, los activados por Ca<sup>2+</sup> o K<sub>Ca</sub>, los sensibles a ATP o K<sub>ATP</sub>, los de rectificación de entrada o K<sub>IR</sub> y los canales de potasio de dos poros o K<sub>2P</sub> (Olschewski, 2010). Los K<sub>V</sub> y el resto de canales permeables a iones activados por voltaje se encuentran constituidos por seis hélices transmembranales, de la S1 a la S6, donde la S4 es la hélice cargada positivamente debido a que contiene residuos de lisina o arginina cada tres

posiciones; haciéndola relevante para la formación del sensor de voltaje; además la unión de estas hélices le permite conformar un poro de selectividad a los distintos iones (Yosimura K y Sokabe M, 2010) (Figura 8).

Según sus cinéticas de activación e inactivación los canales de  $K_v$  se clasifican en  $K_v$  de rectificación tardía, que generan una corriente de activación lenta y con inactivación escasa o ausente y en  $K_v$  de tipo "A", de rápida activación e inactivación (Gutman y cols, 2005). El voltaje transmembranal regula fuertemente la apertura de los canales dependientes de voltaje. Los canales pueden monitorizar el voltaje transmembrana por la translocación de cargas o por la inclinación de los dipolos a través del campo eléctrico (Yosimura K y Sokabe M, 2010). Además la alta permeabilidad de la membrana celular al potasio establece que el potencial de reposo de la mayoría de las células lisas vasculares sea cercano al potencial de equilibrio del potasio, es decir los canales  $K_v$  se activan generando un cambio conformacional por despolarización de la membrana en un rango fisiológico cercano al potencial de membrana en reposo (Mackie y Byron, 2008).

Los canales de potasio contribuyen de manera importante a la regulación de la contracción y crecimiento del músculo liso vascular. A estos canales se les atribuye la conductancia iónica dominante de la membrana de las CMLV y por lo tanto determinan y regulan de manera importante el potencial de la membrana. El potencial de membrana, a su vez, regula la probabilidad de apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  controlados por voltaje (VGCC), y la afluencia de  $Ca^{2+}$  a través de estos VGCC y por lo tanto la contracción intracelular del músculo liso vascular inducida por  $Ca^{2+}$ . El potencial de la membrana también afecta la liberación de  $Ca^{2+}$  de las reservas internas y la sensibilidad a este ion de la maquinaria contráctil de tal manera

que los canales  $K^+$  participan en todos los aspectos de la regulación de la contracción vascular. Por otra parte, los canales de potasio también regulan la proliferación de CMLV a través de mecanismos tanto independientes como dependientes del potencial de membrana, ya que las células vasculares del músculo liso expresan múltiples isoformas de al menos cinco clases de canales  $K^+$  que contribuyen a la regulación de la contracción y la proliferación celular (Jackson, 2017). Al respecto se ha descrito la activación de vías de señalización que inducen la proliferación en células de músculo liso vasculares pulmonares principalmente a través de la activación de los  $K_{V1.3}$  y  $K_{V1.5}$  y la subsecuente corriente entrante de calcio (Cidad y cols, 2012); en este mismo sentido se ha reportado que la apertura de los canales de calcio tipo-L también favorece la proliferación de células de músculo liso (Rodman y cols, 2005), debido a que el calcio se une a la calmodulina y ésta genera la activación de factores nucleares reguladores de la proliferación (Akagi y Cols, 1999).





La activación de los canales  $K_v$  da lugar a un aumento del flujo de salida de  $K^+$ , es decir, hiperpolarización, por lo tanto se favorece el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje y subsecuentemente se genera la disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  y la vasodilatación. Por el contrario, la inhibición de los canales  $K_v$  produce despolarización generando la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y la consecuente vasoconstricción. Asociado al incremento en el tono, el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  induce proliferación de músculo liso (Moudgil y cols, 2006), por lo que los canales  $K_v$  también participan en el remodelado vascular (Remillard y Yuan, 2004).

Se ha descrito que el NO endógeno puede mediar la relajación del músculo liso vascular a través de mecanismos independientes de GMPc, pues se ha reportado que el NO favorece la salida del ion potasio por la activación de los  $K_v$  generando hiperpolarización de las células musculares lisas vasculares, disminuyendo la probabilidad de apertura de los canales de calcio impidiendo la contracción y favoreciendo la relajación vascular (Irvine y cols, 2003). Además, se vuelve ciertamente factible que el NO active los canales  $K_v$  en las arterias de resistencia, porque se ha reportado que las subunidades  $K_{v1.2}$ ,  $K_{v1.3}$  y  $K_{v1.5}$  se expresan en células musculares lisas arteriales de ratas (Irvine y cols, 2003)

Por otra, parte se ha reportado que a nivel pulmonar la lesión de células endoteliales puede resultar en un desequilibrio en los mediadores derivados del endotelio, favoreciendo la vasoconstricción. Esto sumado a los defectos en la actividad de los canales iónico en las células del músculo liso en la arteria pulmonar, pueden contribuir a la vasoconstricción y la proliferación vascular; ya que los factores contráctiles derivados del endotelio favorecen el aumento de la concentración intracelular de calcio e impiden la salida de potasio a través de

los canales Kv, lo que favorece la despolarización celular y la contracción vascular (Gaine y Rubin 1998).

Otro factor que participa en el deterioro de la integridad vascular pulmonar es la hipoxia, ya que se ha descrito que en casos como la exposición a elevada altitud, enfermedades pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva crónica y atelectasia) o la apnea del sueño puede derivar a una hipoxia alveolar generalizada y con una consiguiente vasoconstricción pulmonar hipóxica (Evans y cols, 2011). En estados de hipoxia prolongados se ha descrito un disminución de la expresión y actividad de los canales de potasio, se incrementa la expresión de ET-1, del transportador de 5-HT, aumento de la liberación de factores de crecimiento, 5-HT y TXA2, así como, aumento del calcio intracelular, y activación de mecanismos de sensibilización al calcio (Hae y cols, 2014). Lo anterior enumera a muchos de los factores requeridos para la activación de diversos mecanismos que inducen el desarrollo de HAP, debido a que generan aumento del tono vascular pulmonar, sin embargo, aunque se ha estudiado ampliamente, no hay un acuerdo general acerca del mecanismo de la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Se ha descrito que en el mecanismo fisiopatológico participan algunos canales iónicos dependientes de voltaje y algunas proteínas implicadas en la regulación del calcio, a través de la mediación de la actividad de la NADPH oxidasa mitocondrial (Archer y cols, 1993; Waypa y cols, 2001; Cogolludo y cols, 2009; Perez-Vizcaino y cols, 2010).

Por lo tanto, puesto que los canales Kv, por una parte son activados por el NO y por otra son inhibidos por factores contráctiles endoteliales como la ET-1 (Salter y cols, 1998), el TXA2 (Cogolludo y cols, 2003), la angiotensina II (Hayabuchi y cols, 2001), o por factores endócrinos

como la liberación de la serotonina (Cogolludo y cols, 2006), el ácido araquidónico (Smirnov y Aaronson, 1996) o incluso en la presencia de factores físico-químicos como la hipoxia (Coppock y cols, 2001); se ha propuesto a estos canales selectivos a potasio dependientes de voltaje como mediadores vasoactivos durante la hipertensión pulmonar. Concretamente durante la hipoxia y por lo tanto, en presencia de estrés oxidativo y nitrosativo (disminución de la biodisponibilidad de NO) se ha reportado que la participación de las subunidades  $K_{V1.5}$  y  $K_{V2.1}$  están implicadas en la vasoconstricción arterial pulmonar ya que contribuyen a la despolarización celular y recurrente entrada de calcio, esto tanto en modelos animales como en pacientes humanos (Archer y cols, 1993; Michelakis y cols, 2002). También, se ha observado que los activadores de canales  $K_V$  o la inserción genética de  $K_{V1.5}$  previenen o revierten el remodelado vascular en modelos animales de HP (Michelakis y cols, 2002).

El  $Ca^{2+}$  intracelular está involucrado en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos en las células musculares lisas vasculares pulmonares, tales como, los relacionados con la vasoconstricción pulmonar, la proliferación celular vascular, y la remodelación de este mismo tejido. La contracción del músculo liso vascular disminuye el radio de los vasos sanguíneos pulmonares, lo que lleva a la vasoconstricción sostenida y al aumento de la resistencia vascular pulmonar (Firth y cols 2013). Se ha descrito que los cambios en la expresión de canales iónicos dependientes de voltaje influyen en la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , mediante la despolarización de la membrana, el aumento de la entrada de  $Ca^{2+}$ , la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  de reposo y la sensibilidad contráctil del  $Ca^{2+}$ , que en conjunto contribuyen a la vasoconstricción, y conducen a HAP, por lo tanto sus respectivos bloqueadores se han utilizado clínicamente para el tratamiento de la HAP (Puri y cols, 2007).

Otra importante entrada de calcio involucrada en hipertensión pulmonar, es por la vía denominada como la entrada de calcio operada por receptor (ROCs), donde la estimulación de dichos receptores de membrana dan lugar a la producción de dos segundos mensajeros como el diacilglicerol e inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual abre los ROCs, dando lugar a flujo de Ca<sup>2+</sup> y aumento de su concentración a nivel intracelular (Yamamura y cols, 2013).

#### **1.2.2.2.4. La capa adventicia**

La capa adventicia es capaz de regular la función y la estructura vascular desde el "afuera hacia adentro". Se ha descrito que en la lesión local de la capa adventicia como sobredistensión, la hipoxia, o la infección, se activan los fibroblastos que presentan características fenotípicas que contribuyen significativamente a la remodelación vascular pulmonar (Tuder y cols, 2013). El lecho vascular pulmonar está innervado por el sistema adrenérgico que reside en la capa adventicia, además la norepinefrina es una de las principales moléculas de señalización liberada por estos nervios. En la capa adventicia de arterias musculares de algunos pacientes con hipertensión pulmonar se ha observado un aumento del número de axones adrenérgicos. Sobre la participación directa de la capa adventicia de la arteria pulmonar en el mecanismo vasomotor se puede mencionar a los EROS. Bajo el estricto sentido de la alimentación también las aflatoxinas provenientes principalmente de la dieta por consumir productos agrícolas como maíz (que como mexicanos es tan indispensable en nuestra dieta), cacahuete y frutos secos contaminados con los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (NCEH, 2012), producen radicales libres predominantemente a través de la NADPH oxidasa. Otras fuentes de radicales libres vascular incluyen a la eNOS desacoplada y la xantina oxidasa (Hartney y cols, 2011). Los radicales libres generados en la adventicia pueden funcionar como moléculas parácrinas para modular las células vecinas, lo

que contribuye a la vasoconstricción y la remodelación vascular. El O.- reacciona rápidamente con NO para reducir su biodisponibilidad (López-López y cols, 2001), lo que promueve la vasoconstricción pulmonar desencadenando el aumento de la presión arterial pulmonar.

#### **1.2.2.2.5. Fosfodiesterasa tipo 5**

Los nucleótidos cíclicos como el GMPc actúan como segundos mensajeros intracelulares y se ha reportado que las fosfodiesterasas (PDE) son enzimas cuya principal función biológica es regular las concentraciones citoplasmáticas tanto de GMPc como de AMPc (Kotera y cols, 1999; Corbin y cols, 2002).

Las PDE son expresadas en diferentes tejidos de mamíferos, y a la fecha se han reportado 11 familias de enzimas de PDE, las cuales se clasifican en función de sus propiedades bioquímicas.

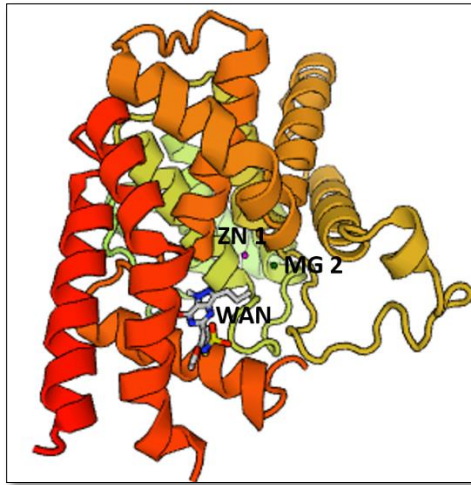
Las PDE son codificadas por más de 20 genes, debido a que cada gen puede generar diferentes variantes. Como resultado del *splicing* alternativo podrían existir más de 100 PDE capaces de degradar ya sea AMPc (pertenecientes a las familias: PDE4, 7 y 8), GMPc (dentro de las familias: PDE5, 6 y 9), o ambos (como el caso de las PDE1, 2, 3, 10 y 11) (Das y cols, 2015; Goupil y cols, 2016).

Los miembros de la familia PDE comparten homología en su dominio catalítico C-terminal, mientras que el dominio regulador aporta la especificidad a las familias PDE y es este último dominio el que incluye a los sitios de unión para los nucleótidos cíclicos, dominios de

interacción proteína-proteína y sitios de fosforilación, además puede estar implicado en la señalización que conducirá a su localización intracelular (Goupil y cols, 2016).

El GMPc es el segundo mensajero más importante que favorece la vasodilatación. La proteína que participa en la degradación de este nucleótido cíclico en el pulmón es la nucleótido cíclico fosfodiesterasa del tipo 5 (PDE5) (Michelakis y cols, 2002), por lo que esta enzima se encuentra implicada en la regulación de la vasodilatación y la presión arterial pulmonar. Debido a que este mecanismo se encuentra fundamentalmente implicado en la génesis de la HAP, la PDE5 se convierte en un blanco farmacológico en su tratamiento, por lo que nos enfocaremos en este tipo de fosfodiesterasa.

La PDE5 tiene un peso molecular de 93 kDa (Moreno y cols, 2004). Para su activación debe ser fosforilada por PKC o PKA en los residuos Ser102 o Ser104. La PDE5 se encuentra principalmente en el citoplasma (Nordgaard y cols, 2004). Esta enzima está conformada por 833 aminoácidos (Protein: NP\_598268.1, NCBI), se encuentra como homodímero, y contiene dos dominios regulatorios: GAFA conformado por los aminoácidos del 122-279 y GAFB conformado por los aminoácidos 305-471, cada uno de los homodímeros contienen una región alostérica de unión al GMPc, que a su vez contienen un sitio de fosforilación ubicado en la posición Ser92, fosforilación que desempeña un papel importante en el mecanismo de activación de cada dominio regulatorio. Al mismo tiempo, en el segmento C-terminal de la proteína (aminoácidos del 546-811) se unen como cofactores los metales divalentes  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Protein, NCBI; Kayik y cols, 2017) necesarios para la actividad ciclasa de la PDE5 (Figura 9). La PDE5 tiene dos dominios estructurales y uno catalítico altamente conservados (Kotera y cols, 1997).

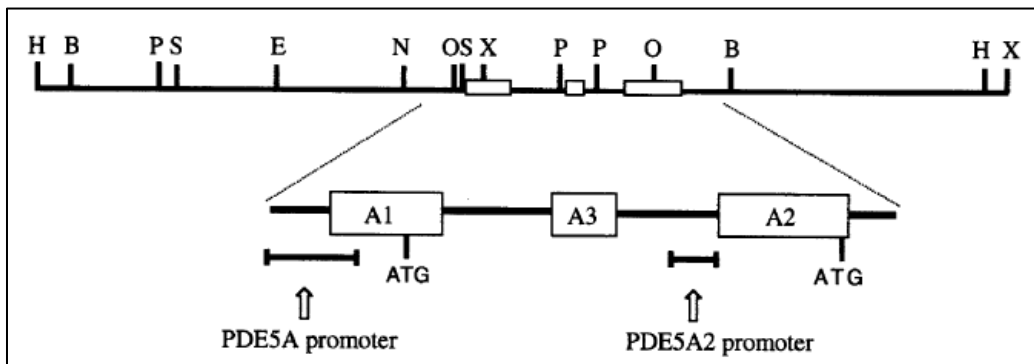


**Figura 9. Fosfodiesterasa cíclica 3',5'-GMPc específica.** Enzima modelada en el programa SWISS-MODEL (ProMod3 Version 1.0.2.) que muestra la estructura tridimensional de la PDE5, así como sus cofactores ZN 1 ( $Zn^{2+}$ ) y MG 2 ( $Mg^{2+}$ ) y el sitio catalítico ocupado por el análogo del GMPc WAN (5-etoxi-4-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-D]pirimidin-5-YL)tiofano-2-sulfonamida).

La PDE5 es codificada por el gen del mismo nombre *pde5* que también se conoce como *pde5A*; está conformado por 24 exones, se encuentra ubicado en el cromosoma 4 en la región 4q26 (Gene: ID 8654, NCBI) y tiene una longitud de 134,685 pb. La expresión del gen de la PDE5 en humanos genera diferentes isoformas proteicas PDE5A1, PDE5A2 y PDE5A3 que son resultado del *splicing* alternativo del RNAm (Lin y cols, 2002); dicho *splicing* genera cambios en la fracción N-terminal de la proteína, lo que determina su localización subcelular, debido a que algunas cinasas fosforilan ciertos aminoácidos que actúan como señales que determinan su transporte y localización sub celular (O'Connell y cols, 1996; Lin y cols, 2002).

Los tres primeros exones alternativos están dispuestos en el orden de A1 - A3 - A2 y se encuentran separados por un intrón de 434 pb y por otro intrón de 361 pb, respectivamente. El intrón anterior al exón específico de A2 posee actividad de promotor que regula la expresión de la isoforma de PDE5A2 independiente de las otras dos isoformas (Figura 10). El promotor de PDE5A2 es pequeño, ya que está conformado únicamente por 182 pb. Sin embargo, contiene una secuencia de unión para el factor de transcripción Sp1 que es indispensable para

la activación de la transcripción del gen. El promotor PDE5A2 sólo puede controlar la expresión de la isoforma PDE5A2, sin embargo, el promotor PDE5A puede inducir la expresión de las tres isoformas, este promotor tiene un tamaño de 139 pb. El promotor no tiene secuencias de unión a factores de transcripción como AP2 o Sp1, sin embargo, responde a la estimulación con GMPc (Lin y cols, 2002). Por lo tanto, la capacidad del GMPc de regular a los promotores PDE5A y PDE5A2 implica que las estrategias terapéuticas dirigidas a favorecer el aumento del GMPc intracelular como el sildenafil y resto de inhibidores de la PDE5 pueden tener un efecto secundario no deseado de activar el gen PDE5A en condiciones basales.

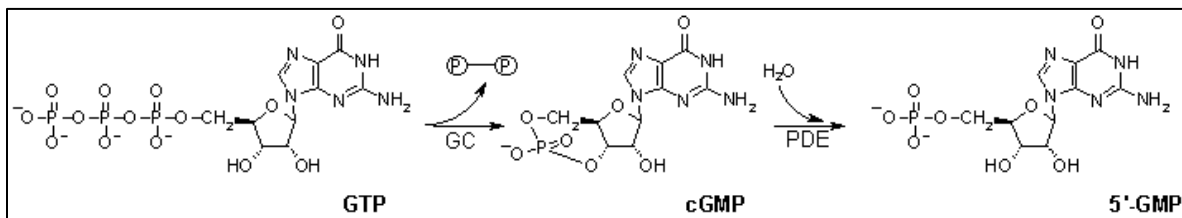


**Figura 10. Mapa genético y de restricción de la región río arriba del gen PDE5A humano.** El fragmento génico completo mostrado aquí es aproximadamente 8,5 kb de longitud. Las tres cajas representan los primeros exones específicos de PDE5A1, A2 y A3. Se muestran los codones de iniciación de la traducción de PDE5A1 y PDE5A2. También se observan los promotores PDE5A y PDE5A2. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son señalados con las letras: B, BspHI; E, EcoRI; H, HindIII; N, NheI; O, NotI; P, PstI; S, SacI; y X, XhoI. (Tomada de Lin y cols, 2002).

La PDE5 se expresa y es activa a nivel pulmonar; también se ha reportado que se expresa y se encuentra biológicamente activa en tejidos como en los cuerpos cavernosos del pene, en el tejido prostático, vejiga y uretra (Wang y cols, 2015), en riñón (Porfi y cols, 2015), y actualmente se ha reportado la presencia de esta PDE en otros tejidos como el cardiaco, aunque todavía se mantiene la discusión de su función fisiológica (Das y cols, 2015).



La porción amino terminal de esta enzima puede sufrir eventos de fosforilación/desfosforilación, unión de  $\text{Ca}^{2+}$  o calmodulina y principalmente media la unión alostérica de GMPc; además puede mediar las interacciones con otras proteínas. La PDE5 contiene sitios de fosforilación para varias cinasas, su fosforilación por PKG aumenta su afinidad por GMPc (Das y cols, 2015). Esta enzima regula la concentración intracelular del segundo mensajero GMPc, de manera que cuando la célula aporta la señal bioquímica para la activación de la PDE5 (PKG principalmente) esta ciclasa hidroliza el grupo fosfato del carbohidrato unido a la guanina que conforma el elemento cíclico generando así su apertura y transformación a GMP (Figura 11), por lo que, su inhibición favorece la acumulación de este nucleótido en células del músculo liso vascular conduciendo a efectos como la relajación de estas células vasculares, inhibición de la proliferación (Bobin y cols, 2016) y efectos benéficos en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar.



**Figura 11. Reacción de transformación del GTP en GMPc y su hidrólisis.** Se observa de izquierda a derecha como la enzima guanilato ciclasa (GC) cataliza la reacción de formación del guanosil mono fosfato cíclico (GMPc) a partir del guanosil tri fosfato (GTP) con la pérdida de dos grupos fosfato. Posteriormente se observa como la fosfodiesterasa (PDE) en presencia de agua hidroliza al guanosil monofosfato cíclico (GMPc) generando 5'-GMP (modificado de Sung y cols, 2003).

Como ya se mencionó, la PDE5 se encuentra en los cuerpos cavernosos del pene, por lo que este tipo de PDE es la enzima diana para el tratamiento de la disfunción eréctil, pues se demostró que inhibidores de la PDE como el sildenafil incrementa los niveles de GMPc generando vasodilatación de estos tejidos favoreciendo el incremento de volumen sanguíneo. Por otro lado, la PDE5 se expresa también en pulmón, y el sildenafil actualmente se ha

empezado a utilizar para el tratamiento de la hipertensión pulmonar (Kayic y cols, 2017), ya que a nivel pulmonar se considera como un fármaco vasodilatador.

En el 2005 Galie N y colaboradores demostraron que el sildenafil causa vasodilatación pulmonar promoviendo un aumento sostenido en el nivel de GMPc durante la hipertensión arterial pulmonar, años después se reportó que el sildenafil, inhibidor de la PDE5 ampliamente utilizado en el tratamiento de disfunción eréctil, disminuye la resistencia vascular pulmonar en humanos con hipertensión pulmonar primaria y que los efectos son sostenidos después de tres años de administración (Rubin y cols, 2011).

Durante la HAP, el deterioro de la vía NO - GMPc - PDE5 en la arteria pulmonar está relacionado con una disminución de la expresión de eNOS en los pacientes con HAP (Giaid y Saleh, 1995), y un aumento de la regulación de la PDE5 en las células músculo liso vasculares. Por lo tanto, la inhibición de PDE5 contrarresta el proceso de deterioro, a través de la promoción de la acumulación del GMPc, resultando en la inhibición de la vasoconstricción pulmonar, del crecimiento contráctil y de la remodelación arterial pulmonar (Bobin y cols, 2016).

En humanos, la isoforma A3 presenta diferentes niveles de expresión que van desde alto (próstata, corazón, uretra, útero y vejiga), hasta niveles no detectables en órganos que carecen de un componente liso o músculo cardíaco (cerebro, hígado, pulmón, riñón y músculo esquelético) y por el contrario las isoformas A1 y A2 se expresan abundantemente en la mayoría de los tejidos anteriormente mencionados. Por lo tanto, es probable que en humanos la isoforma A3 sea específica de los órganos con presencia de tejidos musculares lisos o miocardio (Lin y cols, 2002).

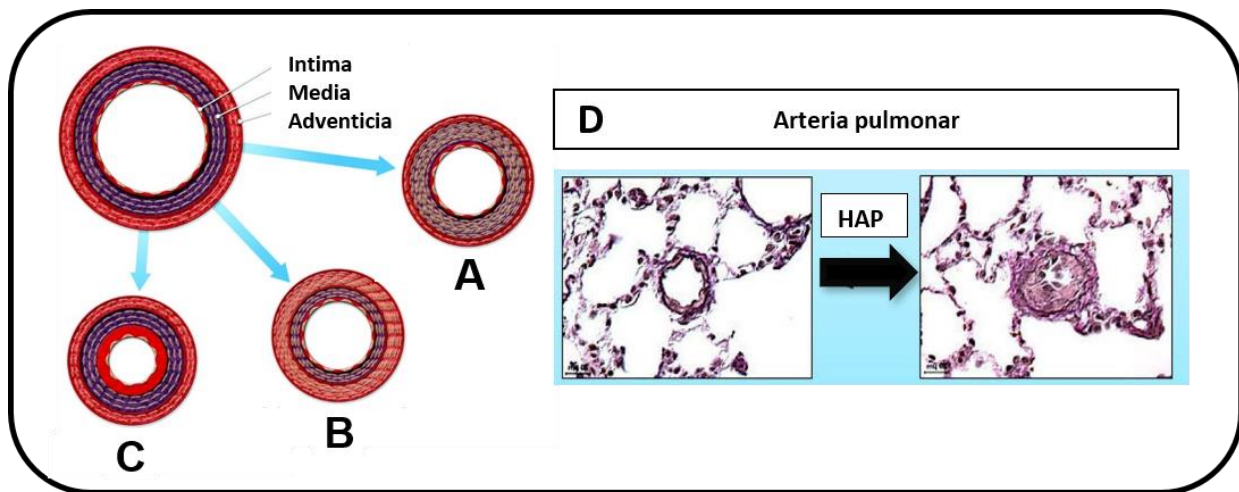
La enzima PDE5 que se expresa en rata es muy similar a la isoforma PDE5A2 presente en el humano. Esta enzima se expresa en los roedores en los mismos órganos donde se expresa la isoforma PDE5A2 humana; está codificada por el gen con el mismo nombre de la proteína (pde5) que se encuentra ubicado en el cromosoma 2 en la posición 2q42; tiene una longitud de 18,537 pb, está constituido por 22 exones (Gene: ID 171115, NCBI) y su RNAm tiene una longitud de 2747 bases. Este gen cuenta con una única región promotora río arriba y su análisis revela que presenta varios elementos de respuesta a los que pueden unirse diversos factores de transcripción para regular tanto positiva como negativamente la expresión del gen. En células de músculo liso vascular se reportó que los elementos de respuesta a AMPc presentes en la región promotora participan en la regulación positiva de la transcripción del gen, siendo uno de los principales factores que favorecen el aumento de la expresión del gen PDE5; además y de la misma manera que en humanos se reportó que análogos del GMPc favorecen la transcripción del gen (Pilz y cols, 1995), por lo que, con estos hallazgos se puede decir que la enzima PDE5 es una forma inducible a partir del aumento de la transcripción del gen pde5 (Kotera y cols, 1999).

El mecanismo de inhibición de la PDE5 por diversas drogas como el sildenafil, tadalafil, vardenafil y avanafil inicia con la competencia por el sitio de unión al GMPc, sin embargo, existen reportes de que estas drogas no son del todo selectivas a la PDE5. A través de análisis computacionales como el acoplamiento molecular (*Docking*) se ha identificado que las familias 5, 6 y 11 de las PDE tienen regiones altamente conservadas en el sitio catalítico que le permiten la unión a los nucleótidos cíclicos, como es el caso de la región cargada positivamente, alrededor de los residuos Gln 817 (PDE5), Gln 773 (PDE6) y Gln869 (PDE11), además de tener una identidad de secuencias aminoacídicas del 64% (PDE6) y 68% (PDE11), respecto a

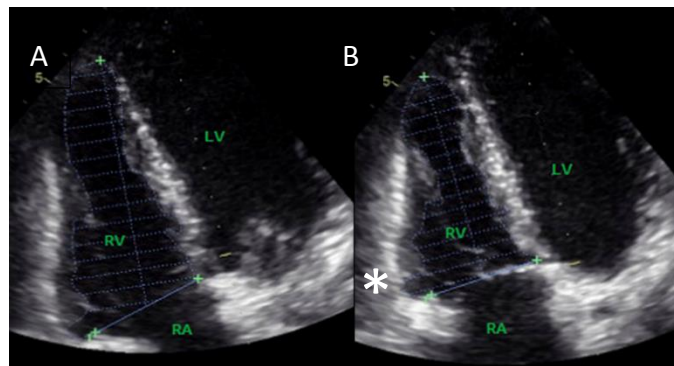
la PDE5 lo que explica por qué ciertas drogas como el tadalafilo se une a estos tres tipos de PDE (Kayik y cols, 2017), lo que podría causar efectos adversos como ceguera parcial, dolor ocular y enfermedad primaria de pigmentación nodular adrenocortical tipo 2 (esta enfermedad es un defecto raro adrenal bilateral que causa síndrome de Cushing independiente de la hormona adrenocorticotropa). Sin embargo, este efecto se observa principalmente a dosis elevadas (>100 mg), por lo que la guía de la práctica clínica del IMSS para el tratamiento de la hipertensión pulmonar (IMSS-433-11) recomienda en el caso del sildenafil como dosis máxima 80 mg por administración.

### **1.2.3. Fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar**

El origen de la HAP es multifactorial, por lo que su génesis puede deberse a alteraciones bioquímicas, endócrinas y/o genéticas, sin descartar factores externos como las drogas o la exposición a sustancias tóxicas. La HAP generalmente inicia con engrosamiento de la capa íntima de las arterias pulmonares por incremento de la proliferación celular vascular, agregación plaquetaria e hipertrofia de las capas media y adventicia. Las células del músculo liso vascular (CMLV) están influenciadas por factores mitógenos, lo que aumenta la capacidad de proliferación; la capa endotelial también sufre de hipertrofia e hiperplasia hasta alcanzar lesiones plexiformes y probablemente obliteración de las arteriolas (Von Seibenthal y cols, 2016) (Figura 12); este conjunto de alteraciones a nivel arterial pulmonar provocan el aumento de la resistencia al flujo sanguíneo lo cual, desencadena hipertrófia ventricular derecha (HVD) como respuesta compensatoria (Figura 13), conduciendo a insuficiencia cardíaca y la muerte.



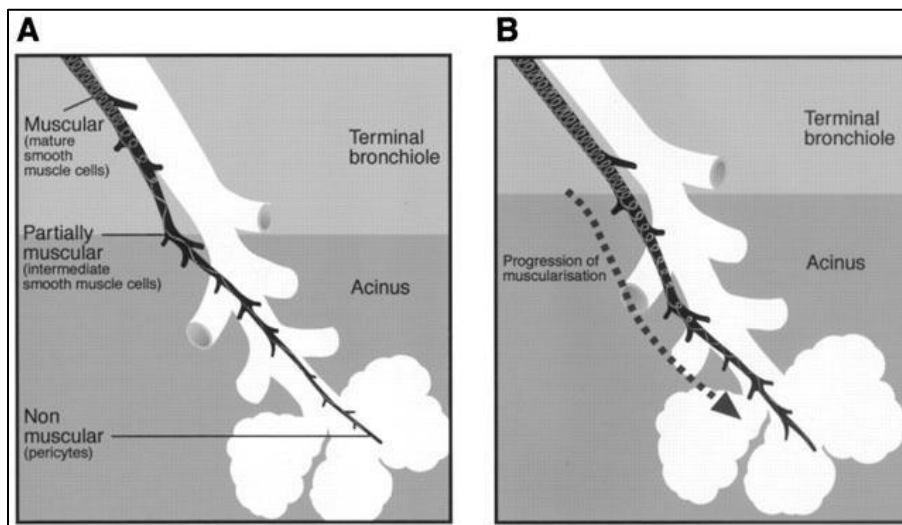
**Figura 12. Alteraciones morfológicas vasculares de las arterias pulmonares durante la hipertensión pulmonar.** A) Hiperplasia de las CMLV. B) y C) Hipertrofia de la capa íntima y adventicia. D) Cambio morfológico de una arteria pulmonar durante la HAP. (Modificada de Galié y cols, 2010).



**Figura 13. Desarrollo de hipertrofia ventricular derecha en pacientes hipertensos pulmonares.** (B) comparada con pacientes sanos (A). El resultado se expresa como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto a pacientes sanos. Tomada de Agoston y Lupu, 2013.

Se ha descrito que cuando el ventrículo derecho se hipertrofia existe un reacomodo de las fibras musculares a nivel del septum (Kind y cols, 2010), lo que complica mantener las funciones cardíacas. Por otra parte, se ha observado un elevado depósito de colágeno en la matriz extracelular, lo que conduce a fibrosis. Una elevada presión ventricular derecha conducirá a un desplazamiento hacia la izquierda del septum (López-Canales, 2015), evidencia característica de pacientes con HAP que afecta la contracción ventricular generando disfunción y alteración de igual manera en la circulación coronaria causando en primer lugar que el flujo de sangre se vuelva bifásico, dependiendo de la contracción y la presión sistólica del ventrículo

derecho (van Wolferen y cols, 2008) y en segundo lugar, que el flujo sanguíneo coronario sistólico por unidad de masa disminuya en paralelo a la progresión de la hipertrofia ventricular derecha, a causa de la disminución de la dilatación microvascular en comparación con la masa ventricular y por la compresión de los vasos durante la sístole. Esto puede explicar la presencia de isquemia subendocárdica en la hipertrofia ventricular derecha grave, tal como se encuentra en la hipertrofia ventricular izquierda (Bogaard y cols, 2009). También se ha descrito que durante la hipertensión pulmonar hay una progresión de la muscularización en las porciones terminales no musculares del árbol arterial (Figura 14), evocada por la hiperplasia, provocando redistribución y diversos fenotipos de las CMLV (MacLean y cols, 2011).

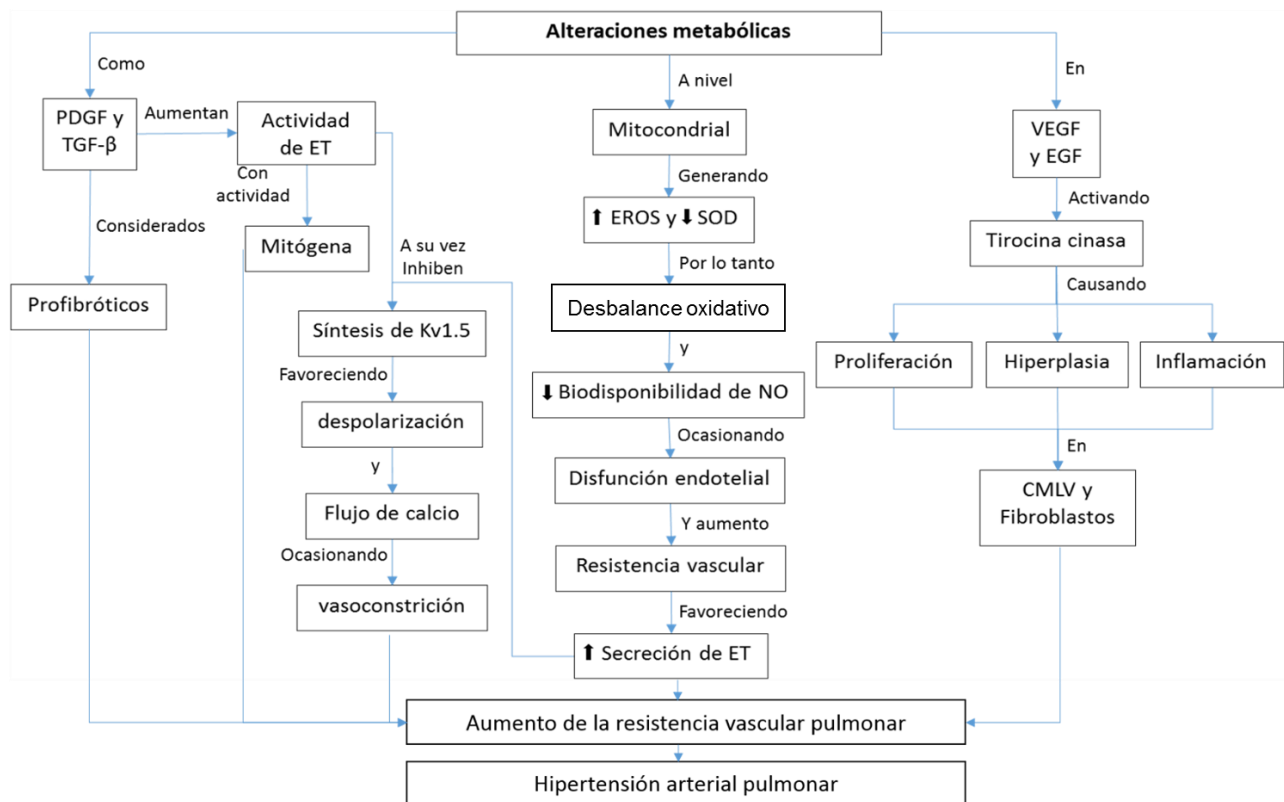


**Figura 14. Representación esquemática de las arterias pulmonares.** (A) En el pulmón normal, hay una distribución desigual de los fenotipos de músculo liso y numerosos vasos precapilares no musculares. (B) En el pulmón hipertenso pulmonar hay progresión de muscularización en la porción terminal no muscular del árbol arterial. Esto se debe a la hiperplasia y la redistribución de fenotipos de las CMLV. Tomada de McLean y cols, 2000.

### 1.2.3.1. Metabolismo

La patología cursa con el desarrollo de algunas alteraciones metabólicas (Figura 15) como es el caso del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), al igual que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que se les considera como pro-fibróticos (Di Paolo y

cols, 1996), así como participantes en el aumento de la actividad y expresión de otra vía pro-fibrótica e hiperplásica como la endotelina-1 (Hua y cols, 2001; Morrell y cols, 2009). Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de crecimiento epidérmico (EGF), se encuentran involucrados en la hiperplasia por activación de receptores a tirosina cinasa en la proliferación e inflamación de las CMLV y fibroblastos (Von Siebenthal y cols, 2016). Algunas funciones a nivel mitocondrial como el cambio en la regulación negativa de la oxidación mitocondrial se ven afectadas durante la HAP (Rehman y Archer, 2010), lo que explica el aumento de las EROS y la disminución de la superóxido dismutasa (Archer y cols, 2013) generando un desbalance oxidativo que desemboca en disminución de la biodisponibilidad del NO y por ende disfunción endotelial, que es considerada como uno de los principales factores de daño a nivel vascular (Bertoluci y cols, 2015). Además se ha demostrado que favorece la aparición de HAP y se le relaciona directamente con el aumento de la resistencia vascular involucrando el aumento de la secreción de endotelina (ET) (Von Siebenthal y cols, 2016), que a su vez tiene una actividad parcial de inhibición de la síntesis de los canales de potasio dependientes de voltaje ( $Kv_{1.5}$ ) induciendo despolarización y por lo tanto favoreciendo flujo de calcio generando vasoconstricción, proliferación y resistencia a la apoptosis (Morrell y cols, 2009).



**Figura 15. Alteraciones metabólicas más importantes que generan hipertensión arterial pulmonar.** TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta, PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, EROS: Especies reactivas de oxígeno, SOD: superóxido dismutasa, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, EGF: Factor de crecimiento epidérmico (modificado de Di Paolo y cols, 1996; Von Siebenthal y cols, 2016).

El proceso de inflamación también participa en la génesis de la HAP principalmente por la liberación de citocinas como interleucinas (IL2, IL6, IL8 o IL10) y quimiocinas por parte de las células endoteliales, este conjunto de sustancias químicas también favorece la proliferación de las CMLV (Soon y cols, 2010).

En la actualidad se considera que las IgG también participa en el origen de HAP, al ser una familia heterogénea puede actuar sobre componentes de células endoteliales donde se une a antígenos de superficie, aunque también se considera que afecta a los fibroblastos y CMLV, causando alteraciones en el tejido conectivo, disfunción de las células endoteliales y esclerosis; Areds y colaboradores en el 2010 encontraron este efecto en el 60% de los pacientes con HAP estudiados; sin embargo, describieron que las terapias inmunosupresoras



no tienen efecto significativo sobre su desarrollo, dejando por lo tanto grandes incógnitas del mecanismo inmunológico involucrado en la génesis y desarrollo de la hipertensión pulmonar.

También se ha descrito que la elastina, componente estructural de los vasos sanguíneos, se encuentra aumentada durante la HAP, elevando también los niveles de desmosina e isodesmosina en plasma y orina (Minkin y cols, 2015), lo que los hace potenciales marcadores de la enfermedad, así como al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la angiogenina que se consideran marcadores de la arquitectura vascular (Seyfarth y cols, 2015). Además, se ha reportado desregulación en la expresión de las metaloproteasas e inhibidores de estas enzimas, aumentando la remodelación vascular en hipertensión pulmonar (Tiede y cols, 2016).

Durante la HAP se genera el aumento de la resistencia arterial pulmonar disminuyendo el flujo sanguíneo e incrementando la poscarga ventricular derecha. Esto provoca niveles mayores del péptido natriurético cerebral (BNP) secretado principalmente en los ventrículos cardíacos en respuesta a un alargamiento excesivo de las células del músculo cardíaco (Fritz y cols, 2013) junto con los del dominio N-terminal del péptido natriurético de la pro-hormona de cerebro (NT-proBNP), que es un péptido relacionado con el miocardio, que refleja el grado de aumento de la tensión de la pared ventricular derecha y el deterioro asociado en la función del ventrículo derecho (Leuchte y cols, 2007).

Las condiciones de oxigenación también pueden participar en la alteración de procesos claves en el desarrollo de HAP. En un modelo animal hipertenso pulmonar con mutación en el receptor de la proteína morfogenética del hueso tipo II (BMPR2), como factor causante de oclusión vascular pulmonar y de disfunción oxidativa y metabólica sistémica, se evaluó la presión

ventricular derecha y el gasto cardiaco en presencia de hiperoxia ( $O_2 > 95\%$ ) (Fessel y cols, 2013). Esto, en condiciones prolongadas actúa como un factor estresante metabólico, causando la disfunción mitocondrial a través de la modificación oxidativa de las membranas mitocondriales, y cambiando el programa metabólico de las células expuestas hacia una dependencia del metabolismo glucolítico (llamado efecto Warburg, que se cree subyace a la proliferación aberrante y a la resistencia a la apoptosis observada en las células malignas). Además aumenta la producción de  $O_2^-$  mitocondrial afectando la vasculatura pulmonar (Rehman y Archer, 2010). Por lo tanto, se describió que la hiperóxia en los ratones de tipo nativo no ejerce ningún efecto sobre presión ventricular derecha y el gasto cardiaco, a diferencia de lo que se observó en los animales con la mutación, en los cuales se describió un aumento significativo de ambos parámetros. Adicionalmente, la hiperoxia aumentó la penetrancia de la mutación a 41% respecto al 20% en condiciones normo oxigénicas, así como la gravedad del fenotipo de la hipertensión arterial pulmonar respecto a los animales no expuestos a hiperoxia. Además en menor medida la hiperoxia también desencadena un incremento en la musculatura de los vasos sanguíneos del pulmón (Fessel y cols, 2013).

#### **1.2.3.2. Genética**

El origen de la HAP puede ser multifactorial incluyendo a factores genéticos, que toman enorme relevancia en los casos de HAP idiopática hereditable por factores como es el caso del receptor BMPR2 que se expresa normalmente en células endoteliales y es un regulador de crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Al ser un receptor con cinasa para TGF- $\beta$  vía Smad; este receptor se encuentra mutado en la HAP en el 70% de los casos cuando la enfermedad es hereditable y en 25% de los casos cuando se considera idiopática (Von Siebenthal y cols, 2016); por lo tanto esta mutación se considera a favor de una excesiva

proliferación, además la proteína osteoprotegerina (OPG) es una sub unidad del TNF alfa que inhibe la apoptosis y por lo tanto, se encuentra altamente relacionada con la hiperplasia vascular pulmonar (Condliffe y cols, 2012); por lo que, ambos factores juegan un papel clave durante la HAP.

Otra proteína relacionada con el desarrollo de HAP es la Caveolina-1 (CAV1) que es altamente expresada en los neumocitos de tipo 1 y su disminución durante la HAP tiene un alto valor biológico (Rameh y Kossaify, 2016). Las mutaciones en CAV1 son una causa rara de HAP, sin embargo, se han descrito casos hereditarios e ideopáticos de HAP por esta causa (Austin y cols. 2012). La expresión de CAV1 es necesaria para la formación de caveolas, que son invaginaciones de 50 a 100 nm de diámetro de la membrana plasmática y vesículas citoplasmáticas presentadas en numerosos tipos de células además de los neumocitos-1, incluyendo las endoteliales y las CMLV. Las caveolas son ricas en receptores de la superficie celular críticos para la iniciación de la cascada de señalización celular Smad 2/3, por lo que mutaciones en Cav1 son mutaciones que resultan en la pérdida de función. Este fenómeno se ha observado en pulmones de los pacientes con HAP y otros tipos de hipertensión pulmonar, proporcionando una relación mecanicista con las normalidades de la superfamilia del receptor de TGF (Ma and Chung, 2014). Otra alteración genética común durante la HAP a causa de la hipoxia, inflamación y el factor inducible por la hipoxia alfa (HIF-1 $\alpha$ ) se da cuando los micro ARN (miRNAs) que son una familia de ARNs no codificantes regulan la traducción de los ARN codificantes y en consecuencia la expresión de la proteína (Grant y cols, 2013; Potus y cols, 2015).

### 1.2.3.3. Desbalance oxidativo

Se ha propuesto que entre las principales enzimas productoras de EROS se encuentra la NADPH oxidasa (NOX), la NOS desacoplada y la COX, además de la mitocondria. La NADPH oxidasa se expresa en las células endoteliales, CMLV, fibroblastos y monocitos o macrófagos (Griendling y cols, 2000; Dikalov, 2011). Esta enzima está compuesta por las subunidades membranales p22phox y NOX1-5 y las subunidades citoplasmáticas p40phox, p47phox, p67phox, Rac y Rap, cuya función principal es la transferencia de electrones desde el NADPH hacia el oxígeno molecular, generando así  $O_2^-$ . El estrés mecánico genera una continua producción de  $O_2^-$  dependiente de NADPH oxidasa en células endoteliales, que favorece la adhesión de monocitos mediada por el factor nuclear  $\kappa\beta$  (Hwang y cols, 2003).

Los principales agentes oxidantes son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las RNS proceden de la oxidación del NO dando lugar a nitritos y peroxinitritos, siendo estos últimos altamente reactivos. Las EROS generadas por la NADPH oxidasa están involucradas en la vasoconstricción de AP inducida por TXA2 e hipoxia (Cogolludo y cols, 2006; Pérez-Vizcaíno y cols, 2010). Se ha descrito que la sobreexpresión de NOX produce un aumento de la presión arterial sistólica e hipertrofia cardíaca en respuesta a angiotensina (Laude y cols, 2005).

Las ciclooxigenasas generan radicales libres durante la segunda fase de la síntesis de los prostanoïdes y participa durante los procesos de maduración neonatal en las arterias pulmonares (Perez-vizcaïno y cols, 2002). Asimismo, a nivel plaquetario uno de los principales productos de la COX, el TXA2, es capaz de activar la NADPH oxidasa por la activación de proteínas Rho, pues ya que a través de sus receptores TP acoplados a proteínas  $G_{12/13}$  activa

al factor intercambiador de nucleótido guanina (Rho-GEF) que hace lo mismo con la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) que fosforila a la miosina fosfatasa (MPase) y favorece el cambio conformacional plaquetario (Cogolludo y cols, 2006; Offermanns, 2006).

Las enzimas antioxidantes más importantes en la pared vascular son la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (Lubranos y Balzan 2015). La SOD cataliza las reacciones de dismutación (aquellas en las que el mismo elemento tiene la función de elemento oxidante y reductor) del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  mediante sus tres isoformas; la SOD-1 tiene un núcleo de  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$  y se localiza en el citoplasma, la SOD-2 con un núcleo de  $Mn^{2+}$  se localiza en la mitocondria y la SOD-3 con un núcleo de  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$  se localiza a nivel extracelular (Zelco y Folz 2005). La SOD-1 tiene una mayor participación en la actividad total de SOD con respecto a la SOD-2 y la SOD-3 (Faraci y Didion, 2004).

Se ha descrito que animales deficientes de SOD-1 desarrollan una mayor disfunción endotelial y aumento de la respuesta contráctil como resultado del incremento de los niveles de  $O_2^-$  y peroxinitritos, y concretamente los roedores deficientes de SOD-2 presentan alteraciones cardíacas, neurodegeneración, daño mitocondrial y mueren a pocas semanas del nacimiento (Faraci y Didion, 2004). La catalasa y la glutatión peroxidasa son enzimas antioxidantes que eliminan uno de los principales factores que conforman al estrés oxidativo como lo es el  $H_2O_2$ , esto mediante su reducción a  $H_2O$ . Como se mencionó anteriormente el estrés oxidativo es uno de los principales factores que interviene en el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar, por lo que, la sobreexpresión de este par de enzimas reduce la vasoconstricción pulmonar hipóxica disminuyendo la probabilidad de desarrollar HAP, mientras que evidencias científicas han demostrado que la inhibición farmacológica de estas enzimas incrementan el riesgo de

desarrollar dicha enfermedad (Frazziano y cols, 2011), haciendo evidente el rol que juegan en el mecanismo fisiopatológico de la HAP.

#### **1.2.3.4. Farmacoterapia**

La lesión y disfunción de las células endoteliales es fundamental para el desarrollo de las anomalías observadas durante la HAP. Por lo tanto, se genera un desequilibrio en los mediadores vasoactivos normalmente producidos por el endotelio (Gabbay y cols, 2007). Principalmente, la patología se genera con la reducción en la producción de prostaciclina, NO y péptido intestinal vasoactivo (VIP), así como con aumento en la producción de endotelina 1 (Humbert y cols, 2004); por lo tanto la terapéutica de la HAP actualmente disponibles actúan al menos en parte, en la corrección de este desequilibrio.

Para el tratamiento de esta enfermedad a los pacientes del grupo I generalmente se les administra alguno de los 13 vasodilatadores pulmonares aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA); desafortunadamente muchos de estos no resultan ser específicos en el tratamiento de la HAP, es decir, que al administrar algunos de estos se comprometen otros sistemas como la circulación mayor, sin mencionar que algunos de ellos resultan ser bastante costosos y tediosos en su administración, además algunas de estas estrategias farmacológicas solo se indican en ciertos grupos de hipertensos pulmonares como el caso del I, IV y V, y en cambio no se sabe el efecto de estos en los pacientes pertenecientes a los grupos II y III; sin embargo, muchos de estos pacientes llegan a desarrollar HAP, por lo que podrían sumar también al grupo I y ser candidatos a la administración de dichas farmacoterapias (Galiè y cols, 2016).

De acuerdo con instituciones internacionales como la European Lung Fundation (ELF), en la guía de la práctica clínica del IMSS para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en México se recomiendan diversas estrategias terapéuticas como es el caso de los bloqueadores de canales de calcio (BCC) como el amlodipino o nifedipino de la familia de las dihidropiridinas; estos BCC al controlar el metabolismo del calcio regulan la matriz extracelular y la producción de colágeno, (Lee y Ping, 1990); el nifedipino al bloquear los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje altera la homeostasis del calcio a nivel intracelular evitando que se desarrollen los mecanismos vasocontráctiles dependientes de calcio (Hemmati y cols, 2014), además se reportó que ejerce una actividad antioxidante en algunos estudios *in vitro* (Lupo y cols, 1994). Otro conjunto de fármacos son los donadores de NO, como el NO inhalado, el cual una vez que haya difundido a la CMLV activará a la GCs y se realizará la vía común a través del GMPc para generar vasodilatación (Hobbs e Ignarro, 1996) o el nitroprusiato de sodio que es un donador intracelular de NO y potente vasodilatador, su uso es exclusivamente en administración intravenosa. El NO inhalado es eficaz para disminuir las presiones pulmonares y mejorar la hemodinámica en pacientes ventilados (Zapol y cols, 1994), pero generalmente se limita a la unidad de cuidados intensivos y generalmente requiere una ventilación con presión positiva. La administración prolongada de NO puede inducir metahemoglobinemia y disfunción plaquetaria (Gabbay y cols, 2007).

Los antagonistas del receptor de la endotelina como el bosentán o el ambrisestán, impiden la unión de la endotelina a su receptor  $ET_A$  a nivel muscular, evitando la activación de la proteína G y por lo tanto la producción de IP3 y DAG, por lo que no generarán aumento de la concentración intracelular de calcio ni la activación de la PKC, respectivamente, evitando de esta manera la contracción muscular (La y Reid, 1995; Kurtel y Ghandour, 1999). El bosentán

fue el primer antagonista de los receptores de endotelina aprobado para el uso de HAP. Existen estudios clínicos que han demostrado que, en la HAP, el uso de bosentán se asocia con una mejor capacidad de ejercicio, con un aumento de la hemodinámica cardiopulmonar, de la calidad de vida, retraso en el empeoramiento clínico y mejor supervivencia (Gabbay y cols, 2007) Desafortunadamente el bosentán es un medicamento con costos muy elevados y por lo tanto de difícil acceso a la población general.

También se ha demostrado que los análogos de prostaciclina como el treprostinil (que puede administrarse por vía intravenosa o por vía subcutánea) y el iloprost (que puede administrarse por vía inhalada o por vía intravenosa) se unen al receptor de la prostaciclina que se encuentra acoplado a una proteína G que activa a la adenilato ciclasa para producir AMPc y de esta manera producir relajación del músculo liso vascular; debido a esto se ha reportado que con ese medicamento se mejora la capacidad de ejercicio (Olschewski y cols, 2002). Un ensayo clínico demostró mejoría en la hemodinámica cardiopulmonar y en la clase funcional cardíaca en los pacientes hipertensos pulmonares pertenecientes al grupo I a partir de los 3 días de uso hasta las 12 semanas (Paramothayan, 2008).

Otro conjunto de fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar son los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 principalmente el sildenafil y tadalafilo (Galie y cols, 2016).

El sildenafil es un activo oral, potente y selectivo inhibidor de PDE tipo 5, que ejerce su efecto farmacológico aumentando la concentración intracelular de GMPc. Este medicamento es aprobado para el tratamiento de la disfunción eréctil, y además, es eficaz para los pacientes



con HAP (Sastry y cols, 2004). El mecanismo de este efecto no está claro y se ha atribuido, al menos en parte, a su capacidad para inducir una vasodilatación aguda de la capa vascular pulmonar (Ghofrani y cols, 2002) debido a que una vez que el NO se encuentra a nivel intracelular en las CMLV activa a la GCs. Esta última biotransforma al GTP en GMPc, el cual por diversos mecanismos favorece la relajación vascular, es decir, los efectos vasodilatadores pulmonares del NO están mediados a través del GMPc, que se degrada rápidamente por la fosfodiesterasa tipo 5 (Galie y cols, 2005). Por lo que, al inhibir selectivamente la fosfodiesterasa tipo 5 con citrato de sildenafil se promueve la acumulación intracelular de GMPc y por lo tanto, aumenta la vasodilatación mediada por NO, además se ha reportado que también puede tener efectos antiproliferativos sobre las células musculares pulmonares (Tantini y cols, 2005) y adicionalmente se ha demostrado que el sildenafil potencia el efecto antimitogénico de nitratos orgánicos en células de músculo liso de la arteria coronaria bovina (Osinski y cols, 2001).

La administración de sildenafil se ha asociado con mejoras en los pacientes pertenecientes al grupo I en cuanto a la hemodinamia y capacidad de ejercicio (Galie y cols, 2005). Además, estudios en pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática demuestran que el sildenafil es benéfico en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (Sastry y cols, 2004).

Actualmente, se ha generado un gran auge en la investigación de los efectos del sildenafil sobre distintas patologías cardiovasculares principalmente, debido a que se le han reportado efectos benéficos como la disminución del estatus oxidativo (Sikandaner y cols, 2017), la disminución de la formación de placas de ateroma (Balarini y cols, 2013) y disminución de la

proliferación celular, así como, la restauración de la función endotelial (Erdogan y cols, 2007) principalmente. Se ha utilizado al sildenafil para tratar la HAP en niños debido a su efecto sobre la relajación de los vasos sanguíneos, lo que permite un mejor flujo sanguíneo en la zona pulmonar y aumenta el efecto del NO por inhibición de la fosfodiesterasa de tipo 5, responsable para la degradación de GMPc, mejorando así la relajación de los músculos lisos y favorece el flujo sanguíneo.

A pesar de las estrategias anteriormente mencionadas en algunos casos no se puede tratar la HP sin comprometer a la presión sistémica y en otros casos no se han descrito completamente los efectos de cualquier índole que generan estas estrategias, por lo que en muchos casos se recurre a la combinación de las terapias mencionadas. A pesar de ello los signos no se han logrado disminuir así como tampoco la mortalidad de estos pacientes.

En la búsqueda de un tratamiento para la hipertensión arterial pulmonar generada por diabetes, nuestro grupo de investigación encabezado por el Dr López-López, han realizado diversas estrategias farmacológicas tratando de inhibir la disfunción endotelial y la hiperrespuesta contráctil a serotonina como principales mecanismos involucrados en la génesis y progresión de la HAP.

#### **1.2.4. Serotonina e hipertensión arterial pulmonar**

La evidencia que apunta al hecho de que la 5-HT tiene un papel en la génesis de la hipertensión arterial pulmonar inició en la década de los 60's con la llamada "hipótesis de la serotonina", que se generó a partir del estudio de la administración del medicamento anorexigénico utilizado en el tratamiento de la obesidad fenilfluoramina. Estudios de microdiálisis *in vivo* en el cerebro

de rata mostraron que este medicamento aumenta la 5-HT extracelular, aumento que se asoció con la presencia de hipertensión pulmonar primaria (HPP) (Abenhaim y cols, 1996) y valvulopatía cardíaca (Connolly y cols, 1997), por lo que fue una preocupación importante en la evaluación de la relación riesgo-beneficio de dichos medicamentos. Por otra parte, datos epidemiológicos rigurosos demostraron y confirmaron que, sumados a la fenfluramina, la *d*-fenfluramina y el aminorex, otros agentes anorexícos aumentan el riesgo de HP (Abenhaim y cols, 1996).

Estudios clínicos y experimentales informaron que el aminorex, la fenfluramina y el bloqueo de las corrientes de salida de  $K^+$  por parte de la *d*-fenfluramina en las células musculares lisas de la arteria pulmonar de rata aumentan la presión de perfusión en pulmón aislado de rata. En consecuencia, se propuso que la inhibición de los canales de  $K^+$  pulmonares podría conducir a HPP en individuos susceptibles mediante el aumento de la presión arterial pulmonar (Rothman y cols, 1999). Bajo este mismo sentido se investigó el papel que tienen los transportadores de 5-HT (SERT) respecto a los medicamentos anorexigénicos relacionados con HAPP y se reportó que el tejido pulmonar contiene SERTs idénticas a la de cerebro (Ramamoorthy y cols, 1993), que sirven para acumular 5-HT circulante, por lo que muestran que todos los fármacos que se sabe que aumentan el riesgo de HPP son potentes sustratos SERT (Rothman y cols, 1999). Por consiguiente, los SERT pulmonares puede funcionar como una "puerta de entrada" que facilita la acumulación y toxicidad posterior de tales fármacos, lo que conduce en última instancia a la HPP. Por otra parte, también se reportó que este tipo de medicamentos inhiben la recaptura de 5-HT y por lo tanto, genera un subsecuente aumento de sus receptores (Rothman y cols, 1999) provocando aumento en la presión arterial pulmonar. A su vez se ha propuesto que el aumento de concentración de 5-HT aumenta la concentración

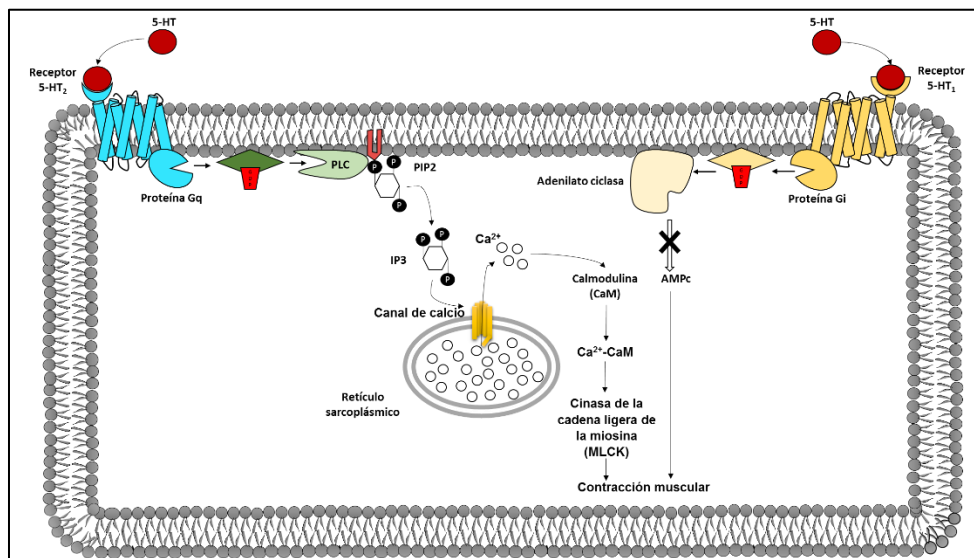
intracelular de calcio al favorecer la liberación a nivel sarcoplasmático (Reeve y cols, 1998) y flujo desde la parte extracelular (Reeve y cols, 1999), resultando en un considerable aumento de riesgo de hipertensión pulmonar.

El mecanismo concreto por el cual estos fármacos aumentaban el riesgo de HPP no se ha determinado. Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que los medicamentos similares a la fenfluramina elevan la 5-HT de la sangre al liberar la 5-HT de las plaquetas, lo que podría causar aumentos crónicos en la presión arterial pulmonar y el crecimiento del músculo liso arterial. (“hipótesis de la serotonina”).

En el humano la 5-HT genera tanto vasoconstricción como vasodilatación dependiendo de la capa vascular en la que actúe (Gamoh y cols, 2013); por lo tanto, y principalmente los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> tienen un rol importante en la patobiología de la HAP, pues modifican el tono vascular en arterias pulmonares pequeñas (Morecroft y cols, 1999; Gamoh y cols, 2013).

El mecanismo de acción de las familias de los receptores tipo 1 (proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>) es inhibir la adenilato ciclasa y los de tipo 2 (G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>) es la activación de la PLC, así como la vía G<sub>α</sub> y activación de RhoA evocando vasoconstricción a través de la activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) e inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (Matsuo y cols, 2011), por lo que a ambos tipos de receptores se les asocia con la regulación del tono de los vasos sanguíneos (Figura 16).

La 5-HT es secretada por las células neuroendócrinas pulmonares y los cuerpos neuroepiteliales de las vías respiratorias en respuesta a estímulos como la hipoxia la cual es una condición que aumenta la sensibilidad a 5-HT y la cantidad de transportadores 5-HTT, teniendo a su vez como acción secundaria el aumento de su actividad (MacLean y cols, 2000), y una alta concentración de 5-HT. Estos cambios tienen efectos mitógenos que toman parte en el engrosamiento de la pared vascular (Rabinovitch y cols, 2012; Humbert y cols, 2004; Morrell y cols, 2009; Hassoun y cols, 2009). Paralelo a estos efectos existen múltiples eventos microtrombóticos en las arterias pulmonares, promovidos principalmente por la activación de la coagulación intravascular, la disfunción plaquetaria y la alteración en la relación de los vasoconstrictores y mediadores pro-coagulantes de la célula endotelial.



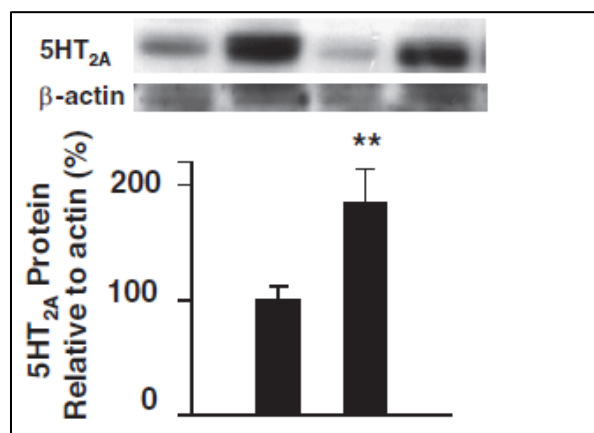
**Figura 16. Mecanismos de vasoconstricción dependientes de la activación de proteínas G evocados por serotonina.** Los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub> se encuentran unidos a la proteína Gq, que activa la vía de señalización por fosfolípidos de inositol aumentando la concentración citoplasmática de calcio, y los receptores de la familia 5-HT<sub>1</sub> están unidos a proteínas Gi que inhiben a la adenilato ciclasa impidiendo la formación de AMPc (modificado de Alberts y cols, 2002).

Eddahibi y colaboradores reportaron en el 2006 que el gen del 5-HTT se encuentra particularmente aumentado en la capa media de las arterias pulmonares durante la HAP primaria, y además se sabe que un incremento local de esta sustancia contribuye a la HAP

(McLean y cols, 2000), ya que se ha demostrado que juega un papel importante en la génesis de la patología al promover la proliferación de las CMLV pulmonares, lo cual se convierte en un importante componente de la remodelación arterial pulmonar durante la HAP, al favorecer el aumento de la vasoconstricción y la microtrombosis a nivel arterial pulmonar (McLean y cols, 2000).

La 5-HT promueve la proliferación de las CMLV pulmonares, la vasoconstricción y microtrombosis local (Fanburg y Lee, 1997), e inicia la acción mitógena a través de la unión de la serotonina con los receptores de superficie celular 5-HT<sub>2A</sub> y posterior activación de la vía fosfatidilcolina específica de la fosfolipasa C activando proteínas cinasas que conllevan a la activación de factores de transcripción (Goppelt y Stroebel, 1998). Además en pacientes con HAP se ha descrito un aumento en la expresión y función de los 5-HTT (Eddahibi y cols, 2001), los cuales favorecen la entrada de serotonina a las CMLV y subsecuente aumento de las especies reactivas de oxígeno, activación subsecuente de la vía de señalización para proliferación (McLean, 2007) y activación de los receptores a 5-HT (Welsh y cols, 2004).

En una patología como la diabetes se analizó el posible papel de los cambios en los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el desarrollo de la HAP. Se observó un aumento de su expresión en homogenizados de pulmón por Western blot, y se reportó un aumento en la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de 2 veces en ratas diabéticas respecto a ratas control (López-López, 2011) (Figura 17), haciendo evidente que este tipo de receptores tienen un alto grado de participación en el desarrollo de HAP.



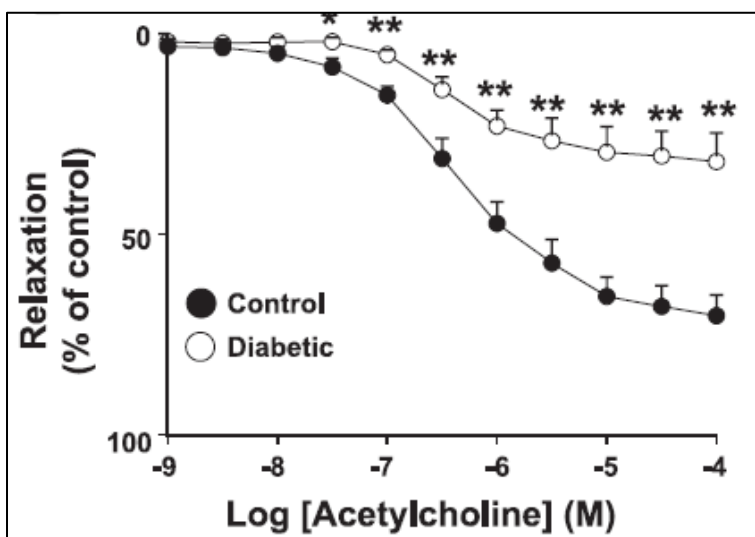
**Figura 17. Expresión de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en pulmones de ratas diabéticas.** y controles paralelos. Los resultados son expresados como la media ± EEM. \*\*P < 0,01 vs control. (Tomada de López-López y cols, 2011).

### 1.3. Diabetes mellitus e hipertensión arterial pulmonar

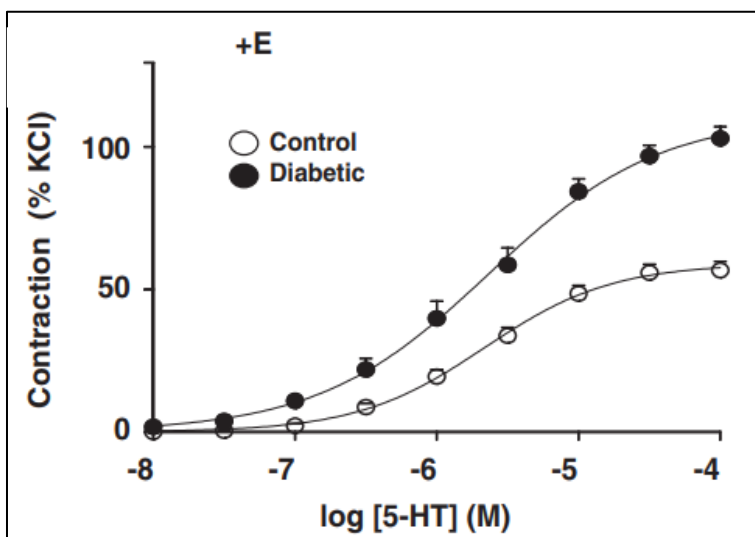
Se han hallado evidencias de que, no solo la DM puede predisponer a la HP, sino que también puede empeorar el pronóstico de aquellos individuos con HAP que desarrollan DM (Secretaría de Salud, 2010; Grinnan y cols, 2016). En la bibliografía podemos hallar evidencia que indica esta relación entre las dos entidades patológicas, pero en su momento se le prestó poca o nula atención. Al respecto se ha reportado que en el modelo de rata diabética inducida por estreptozotocina, se genera hipertrofia ventricular derecha. Sin embargo, este hallazgo no fue considerado en un inicio como un indicador del incremento de la presión a nivel pulmonar (Al-Shafei y cols, 2002). En el 2004 se describió que en pacientes humanos la DM es un fuerte factor que incrementa el riesgo de sufrir falla cardíaca, enfermedad coronaria e hipertensión, así como disfunción sistólica, diastólica y ventricular derecha (Kosmala y cols, 2004).

El incremento del estrés oxidativo da lugar a la disminución de la biodisponibilidad del NO generando disfunción endotelial (Figura 18) favoreciendo entonces un posible incremento de la resistencia vascular pulmonar, que aunado al incremento de la respuesta contráctil a agonistas como la 5HT (López-López y cols, 2011) (Figura 19), puede explicar la presencia de

HAP inducida por la DM en un modelo experimental (Moral-Sanz y cols, 2012) (Figura 20). Sin embargo, los mecanismos subyacentes aún se deben seguir estudiando. En este proyecto evaluamos si la HAP inducida por la diabetes está relacionada con la vía de señalización mediada por el NO empleando como herramienta a un inhibidor de la PDE5.

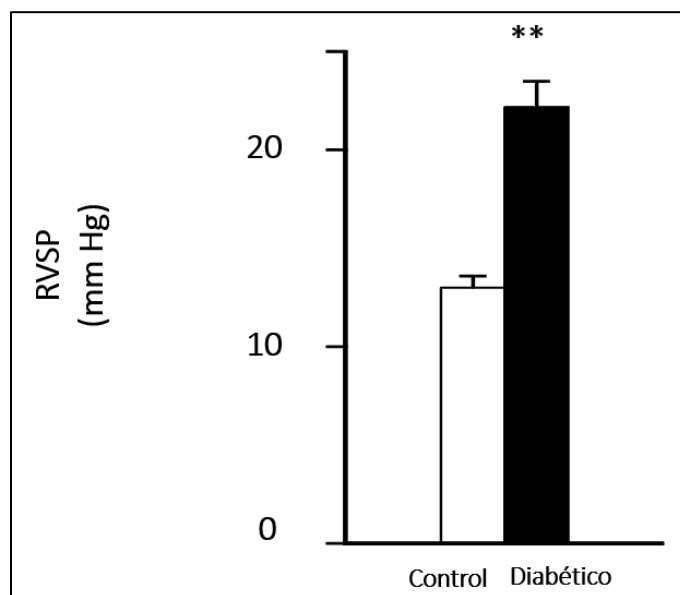


**Figura 18. La diabetes induce la disfunción endotelial.** En arterias pulmonares de ratas control y diabéticas se analizaron las respuestas vasorelajantes a la acetilcolina. Los anillos arteriales fueron pre estimulados con fenilefrina (100 nmol / l). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0,01$  vs anillos control. (Tomada de López-López, 2008).



**Figura 19. Arterias pulmonares de ratas diabéticas son hiperreactivas a 5-HT.** Efecto vasoconstrictor inducido por 5-HT en arterias pulmonares de ratas diabéticas y control con el endotelio-intacto (+E). (Tomada de López-López, 2011).





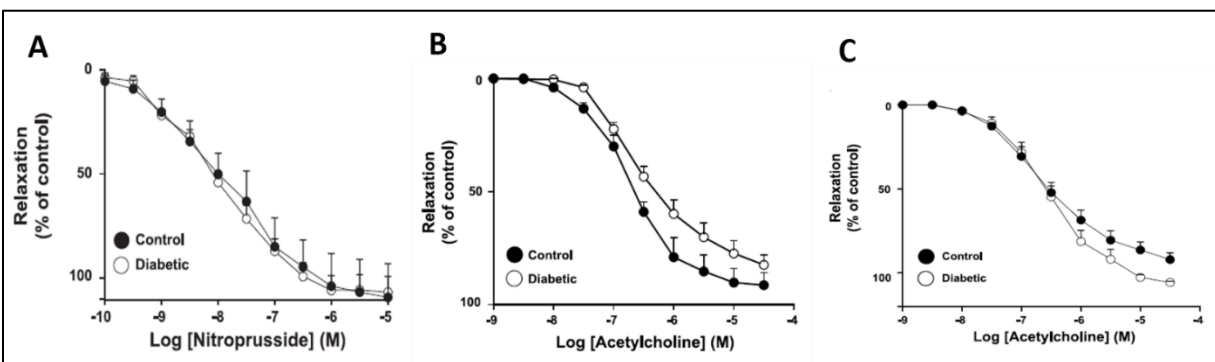
**Figura 20. La diabetes incrementa la presión arterial pulmonar.** Se midió la presión sistólica ventricular derecha (RVSP). Cada columna representa la media  $\pm$  EEM en ratas control ó diabéticas. \*\*  $P < 0,01$  vs control. (Tomada de Moral-Sanz, 2012).

Entre los mecanismos evaluados y dirigidos concretamente a la disminución de la resistencia vascular pulmonar se encuentra la administración de un donador intracelular de NO como lo es el nitroprusiato de sodio (NPS), el cual de manera directa activa a la GCs en las CMLV imitando los efectos del NO endotelial. Al comparar la relajación inducida por la GCs no se observaron diferencias entre el porcentaje de relajación de una arteria pulmonar diabética respecto a la relajación de arterias pulmonares control (López-López y cols, 2008) (Figura 21A), es decir, que al evitar el paso de la difusión del NO de la célula endotelial a la CMLV se evita la disminución de la biodisponibilidad de NO. Sin embargo, no se podría aplicar esta estrategia terapéutica sin comprometer a la presión arterial sistémica, por lo que se evaluaron otros mecanismos como la administración de un barredor de radicales libres, la enzima superóxido dismutasa (SOD), que como era de esperarse, debido a que el principal origen de la disfunción endotelial radica en el estrés oxidante, mejoró la función endotelial de las arterias pulmonares diabéticas hasta los niveles de la arteria pulmonar control (López-López y cols, 2008) (Figura 21B). Con el conocimiento de que la disfunción endotelial es generada por estrés oxidativo proveniente principalmente de la NADPH oxidasa, se probó la inhibición de la NADPH

oxidasa (principal fuente de EROS a nivel vascular) con apocinina, y de la misma manera que con NPS y SOD tampoco se observaron diferencias significativas entre arterias pulmonares control y DM (López-López y cols, 2008) (Figura 21C)

Por otra parte, se realizó un experimento encargado de evaluar el efecto que tendría el inhibir de manera competitiva con ketanserina a los receptores  $5HT_{2A}$  sobre la respuesta contráctil a serotonina. Este fármaco produjo un desplazamiento hacia la derecha de la curva de las concentraciones respuesta a 5-HT, lo cual sirvió como un indicador de la potencia del antagonista y para indicar que estos receptores parecen desempeñar un papel importante en la contracción 5-HT (López-López y cols, 2011). La potencia de ketanserina fue similar en los animales control y los animales diabéticos.

Actualmente debido a todas las evidencias científicas que se han ido acumulando sobre el efecto que tienen los inhibidores de la PDE5, pareciera ser que este es un conjunto de fármacos que podrían actuar en diversos puntos clave para evitar la presencia de HAP de cualquier tipo, incluida la HAP inducida por DM.



**Figura 21. Evaluación de la disfunción endotelial.** A: relajación inducida por nitroprusiato de sodio en las arterias pulmonares estimuladas con fenilefrina (100nmol / l). B: efecto de la preincubación con superóxido dismutasa (SOD, 100 U / ml) sobre la disfunción endotelial. C: efecto de la preincubación con apocinina (300  $\mu$ mol / l) sobre la disfunción endotelial (Tomada de López-López y cols, 2008).

### **1.3.1. El papel del estrés oxidativo y disfunción endotelial en el vínculo diabetes hipertensión pulmonar**

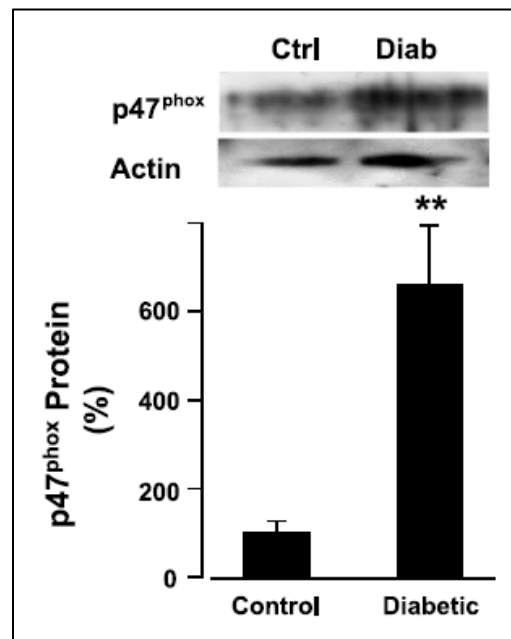
Evidencias científicas indican que la hipoglucemia juega un papel importante en las complicaciones de la DM (Wright y Frier, 2008) pues se ha descrito que causa estrés oxidativo (Singh y cols, 2004), inflamación (Gogitidze y cols, 2010) y disfunción endotelial (Wang y cols, 2013). Además, se le asocia con enfermedad cardiovascular y tanto estudios básicos como epidemiológicos han demostrado esta relación entre diabetes, estrés oxidativo pulmonar y disfunción vascular (Fouty, 2008).

Al inicio de la década pasada se describió que la incubación de células endoteliales *in vitro* con altas concentraciones de glucosa activa la proteína cinasa C y aumenta la expresión del gen de eNOS así como la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Por otro lado, en un modelo de rata diabética inducida con estreptozotocina se generó disfunción endotelial, efecto que se le adjudicó al aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular que condujo a la disminución de la biodisponibilidad del NO vascular en aortas diabéticas. Dicho efecto se observó revertido cuando se administró un hipoglucemiante (Zhonglin y cols, 2008).

Aunque la expresión de la eNOS fue notablemente mayor se le identificó como una fuente de O<sub>2</sub><sup>-</sup>; al mismo tiempo se observó aumento en la activación de la NADPH oxidasa y un aumento de 7 veces en RNAm de gp91<sup>phox</sup> en vasos diabéticos (Hink y cols, 2001).

Por otra parte, en un modelo de rata diabética tipo 1 se ha reportado el aumento de la subunidad p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxidasa (Figura 22) lo cual conduce a un incremento del O<sub>2</sub><sup>-</sup> provocando disfunción endotelial en arterias pulmonares (López-López y cols, 2008).

Cuando se inhibe la producción de ATP o disminuyen sus concentraciones, se favorece la activación de la cinasa de AMP (AMPK), la cual incrementa la biotransformación de AMP a ATP, por lo que se considera como un componente celular fundamental de respuesta al estrés (Hardie y Carling, 1997). Esta cinasa es fosforilada y activada en diversos tejidos por hormonas y sustancias que actúan a través de diferentes grupos de receptores (Kishi y cols, 2010; Moule y Denton, 1998), y por oxidantes como el peroxinitrito (Zou y cols, 2003) y el peróxido de hidrógeno (Choi y cols, 2001). La activación de la AMPK desencadena diversas funciones a nivel metabólico, pero, por otra parte, también la eNOS es un blanco de esta cinasa que previene el estrés oxidativo asociado a la diabetes, en parte debido al aumento de la regulación de la proteína de desacoplamiento mitocondrial (UCP-2) (Zou y cols, 2004) que reacciona y disminuye al  $O_2^-$  y la nitración de la prostaciclina cinasa causada por las altas concentraciones de glucosa (Zhonglin y cols, 2008).



**Figura 22. Rol de la NADPH oxidasa.** Expresión de la subunidad p47<sup>phox</sup> en homogenizado de arteria pulmonar analizado por Western blot. Los valores densitométricos fueron normalizados con la actina y presentados como porcentaje de valores respecto al grupo control. (Tomada de López-López, 2008).

La producción de O.- ha sido relacionada de manera directamente proporcional con el aumento de la glucemia, debido a que el estrés oxidativo también es producto de alteraciones a nivel mitocondrial durante la hiperglucemia (Giacco y Brownlee, 2010) al igual que durante la hipoglucemia (Singh y cols, 2004); de hecho se le considera como el factor común en la génesis de la disfunción endotelial y la inflamación en ambos casos.

Se tomó como indicadores de la función endotelial a los mediadores de la dilatación endotelial los cuales se encontraron disminuidos significativamente en las personas con DM1 indicando la presencia de disfunción endotelial, y al producir hiperglucemia en sujetos sanos se observó el mismo efecto pero más pronunciado, debido a que no cuentan con “memoria metabólica”; a la par de estos resultados se encontraron aumentados los niveles de los indicadores de estrés oxidativo e inflamación, respecto a pacientes normoglucémicos (Ceriello y cols, 2012). Simultáneamente el tratamiento con antioxidantes disminuye el estrés oxidativo, mejora la función endotelial y disminuye la inflamación (Ceriello y cols, 2012).

La vasodilatación independiente del endotelio no se modifica con el cambio de las concentraciones de glucosa (Ceriello y cols, 2012), sin embargo, recientemente se les considera tanto a la hiperglucemia como a la hipoglucemia factores que participan en el desarrollo de aterotrombosis e inflamación, por lo tanto se sugiere que en la práctica clínica se corrijan gradualmente los niveles de glucemia en los pacientes diabéticos.

La NADPH oxidasa es una fuente de O.- y se clasifica en grupos denominados NOX (NADPH oxidasa sistémica). De acuerdo a los homólogos que se han reportado para la sub unidad catalítica de esta enzima (gp91<sup>phox</sup>) denominada NOX2. En humanos existen 7 isoformas

distintas de esta enzima las cuales se clasifican en tres grupos: el grupo NOX2 conformado por las isoformas (NOX1, NOX3 y NOX4, el grupo conformado por dual oxidasas (DUOX1 y DUOX2) y el tercer grupo NOX5. Estas distintas isoformas varían en su mecanismo de activación y distribución. En las tres capas que conforman los vasos sanguíneos han sido detectadas la NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5 (predominando en la capa adventicia) (Pedyala y cols, 2009). Además, son probablemente a nivel vascular la principal fuente de O.- (Perez-Vizcaíno y cols, 2002).

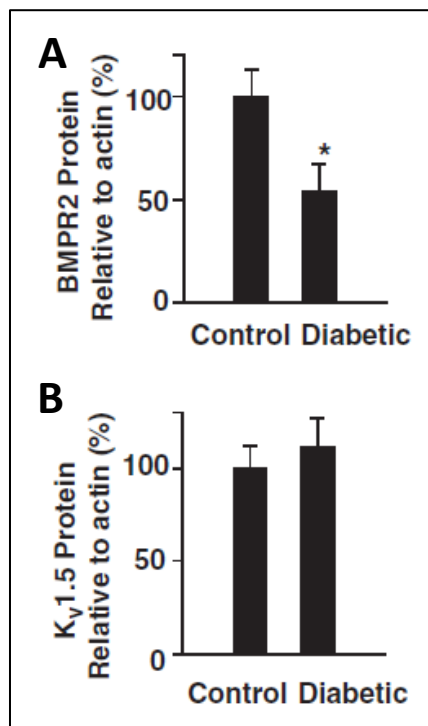
Las EROS generadas por las NOX vasculares pueden actuar como mensajeros y activar señales intracelulares en un rango de vías que involucran regulación del tono vascular, proliferación y apoptosis, respuesta inflamatoria, fibrosis y calcificación. En células patológicas se encuentra presente la NOX2, la cual se encuentra compuesta por las sub unidades p22<sup>phox</sup> y NOX2, sin embargo, para su activación se requiere del reclutamiento citosólico de las sub unidades p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y Rac-1. NOX 4 se encuentra ampliamente expresado en células endoteliales y en células del músculo liso vasculares pulmonares, para su actividad no necesita de reclutamiento de otras subunidades pues su actividad es constitutiva. Adicionalmente las NOX pueden ser activadas por el estímulo de receptores acoplados a proteínas G (5-HT, endotelina, TXA2, angiotensina-II y trombina), citocinas o cambios en los niveles de oxígeno (Briones y Touyz, 2010). Es sabido que la hiperoxia es una fuente de estrés oxidativo por incremento de O.- mitocondrial, y la hipoxia es uno de los métodos utilizados para generar hipertensión pulmonar experimental. Por otra parte, la hiperoxia es capaz de generar estrés metabólico debido a que causa disfunción mitocondrial a través de la modificación oxidativa de las membranas mitocondriales, así como, de la vía del metabolismo glicolítico (Rehman y cols, 2010).

La mitocondria también es una fuente importante de EROS en el sistema cardiovascular en condiciones fisiológicas, pues se considera que entre el 2-3% del oxígeno consumido es derivado en este tipo de especies. Este organelo contiene enzimas involucradas en el metabolismo del piruvato y de ácidos grasos para producir acetil coenzima A (ACoA) que con ayuda de NADH y FADH<sub>2</sub> forman un gradiente de protones en el interior de la membrana mitocondrial, usado para la síntesis de ATP (Pérez-Vizcaino y cols, 2010). La producción mitocondrial de EROS es dependiente de su biogénesis, de su fusión-fisión y de sus procesos bioenergéticos, así como de alteraciones en los diferentes procesos genético-moleculares de la mitocondria y su localización (Rathore y cols, 2008; Waypa y cols, 2010). La producción mitocondrial de EROS es dependiente de la concentración de oxígeno, y curiosamente genera el mismo efecto tanto el aumento como la disminución de este elemento respecto a las concentraciones celulares basales (Stowe y Camara, 2009). La disfunción mitocondrial ha sido demostrada en muchos modelos animales con HAP, así como en humanos. Por lo tanto, el estrés oxidativo ha sido asociado con esta enfermedad no solo en su génesis, sino que también la exacerba esta condición; por lo que algunos estudios muestran que la reducción de las EROS es benéfica en modelos con HAP. Finalmente, la regulación mitocondrial de la producción de EROS es seguida por la activación de otros factores de transcripción con un rol fisiopatológico en la hipertensión pulmonar (Rabinovich, 2008). Sin embargo, no son los únicos, ya que también el NO y metabolitos de nitrato actúan como reguladores mitocondriales dependientes de GMPc en algunos casos.

Los receptores tipo 2 de la proteína morfogenética del hueso (BMPR2) y los canales de potasio dependientes de voltaje (K<sub>v1.5</sub>) son proteínas clave implicadas en la aparición y desarrollo de HAP. Durante la diabetes se observó un claro aumento en la regulación de la expresión del

BMPR2 a nivel pulmonar (Figura 23A). En contraste, la expresión de la proteína del canal  $K_{v1.5}$  no se modificó significativamente en estos animales diabéticos (Figura 23B). Sin embargo, se ha reportado que los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) juegan un rol importante en la regulación del tono vascular pulmonar y la inhibición de estos contribuye a la vasoconstricción pulmonar hipóxica (Archer y cols, 1993). En presencia de EROS modifican su sensibilidad a la oxidación y reducción de los agentes (redox), y respecto a estos cambios aumenta o disminuye la amplitud de la corriente de K respectivamente (Olschewski y cols, 2004), modificando el potencial de membrana, alterando la probabilidad de apertura de los canales de calcio y por lo tanto las concentraciones intracelulares de este ion. Aunado a esto se ha demostrado la relación del aumento del calcio con la sensibilidad de los canales de rianodina en las arterias pulmonares, los cuales al desensibilizarse al  $Ca^{2+}$  favorecen el aumento de su concentración intracelular y aumento de la vasoconstricción en un modelo de rata (Pourmahram y cols, 2008). Bajo este mismo sentido la mutación del BMPR2 puede ser inducida por estrés oxidativo y metabólico y se ha mostrado en asociación con la mayoría de los casos que desencadenan en HAP hereditable o idiopática. Debido a esto, la propia mutación del BMPR2 generada por hipoxia ó hiperoxia es suficiente para causar estrés metabólico y daño oxidante mitocondrial, ya que se encontró que en cultivos de células endoteliales que presentan esta mutación produce el aumento de productos de lipoperoxidación, sin embargo, no es suficiente para causar daño oxidativo metabólico en condiciones basales. De la misma manera la expresión de mutaciones en el BMPR2 *in vivo* causa substancial oxidación en mitocondrias de hepatocitos.





**Figura 23. La diabetes disminuye la expresión de BMPR2 pero no de Kv1.5.** A y B, expresión de BMPR2 (A) y Kv1.5 (B) en los pulmones de diabéticos y control paralelo. La expresión fue medida por Western blot. \*P < 0,05 vs control. (Tomada de López-López, 2011).

Por su parte en condiciones basales durante el metabolismo del ácido araquidónico también se puede generar O.- de tres principales maneras: la primera es la vía de la ciclooxigenasa ya que la síntesis de las prostaglandinas o tromboxanos es en presencia de COX y como ya describimos, esta enzima es una de las principales fuentes de O.- a nivel vascular. La segunda es la vía de la lipooxigenasa, la cual produce ácido hidroxieicosatetranóico que puede ser un mediador en la producción de EROS a nivel vascular y la tercera es la vía de la citocromo P-450 monooxigenasa, por la cual se pueden generar varios epóxidos e hidroxiácidos (Pérez-Vizcaino y cols, 2010). Por lo tanto, Los prostanoides al ser sintetizados por la acción de la PLA2, de la COX y ser dependientes de la expresión relativa de las enzimas que metabolizan la PGH2 y TX en cada tipo celular, se esperaría que aumente la producción de O.- durante la diabetes debido a las alteraciones propias de esta enfermedad metabólica.

Otra importante fuente de EROS es la eNOS, que es un complejo enzimático homodimérico que cataliza la formación de NO a partir del aminoácido L-arginina por transferencia electrónica entre el cofactor NADPH, el grupo hemoprostético y la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Dicha enzima puede desacoplarse bajo condiciones limitantes de L-arginina o de la BH<sub>4</sub> y los electrones pueden transferirse al oxígeno con la subsecuente formación de O<sup>-</sup> y decremento de NO.

Existen otras fuentes de EROS como es la xantina oxidasa (XO) presente en el endotelio vascular, cataliza la formación de hipoxantina a xantina y ésta a su vez a ácido úrico generando NADH y O<sup>-</sup> (Pérez-Vizcaino y cols, 2010), o la monoaminoxidasa que genera O<sup>-</sup> durante el metabolismo de las enzimas, incluso generadas por reacciones no enzimáticas producto de la autooxidación endógena, entre otras fuentes.

Las EROS pueden tener diferentes blancos a nivel intracelular por medio de los cuales causan las alteraciones arteriales pulmonares que conducen a la hipertensión. Las proteínas cinasas juegan un papel importante en el control de las funciones celulares como la proliferación, motilidad, contracción y apoptosis, y son uno de los principales blancos de las EROS. Concretamente las Rho cinasas y la proteína cinasa C (PKC) actúan de manera directa en el control de los mecanismos intracelulares que conducen a la regulación del tono vascular, modificando tanto la concentración intracelular del ión calcio como de la sensibilización de sus efectores. Además, se ha demostrado que la PKC es una importante molécula que en respuesta a las EROS activa la cascada de señalización en el músculo liso vascular (Oeckler y cols, 2005).

De manera fisiopatológica las EROS tiene un rol específico en el desarrollo de HAP, pues tanto el O.- como el peróxido de hidrógeno son moduladores del tono vascular, pero se ha observado que principalmente el O.- contrae de manera reversible a la arteria pulmonar. Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera tanto contracción como relajación fisiológica dependiente principalmente del factor contráctil dependiente del endotelio y por el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio; concretamente en arterias pulmonares induce respuesta contráctil (Cogolludo y cols, 2006).

Es perfectamente sabido que la pronta reacción entre el O.- y el NO es un mecanismo que induce disfunción endotelial tanto a nivel sistémico como a nivel pulmonar y este efecto se potencia cuando hay un aumento de las fuentes productoras de O.- bajo condiciones patológicas o inhibición endógena de SOD (Lopez-Lopez y cols, 2008, 2001). Por otra parte, también la inhibición de las enzimas Cu/Zn SOD y el incremento de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorece la remodelación vascular caracterizada por hipertrofia, sugiriendo por lo tanto que la presencia de EROS estimula la proliferación celular (Wedgwood y cols, 2001).

El incremento de las EROS han sido asociadas en arterias pulmonares con el estímulo de diferentes vías de señalización como las del TXA<sub>2</sub>, endotelina-1, angiotensina-II y 5-HT (Briones y Touyz, 2010; Cogolludo y cols, 2006; Jernigan y cols, 2008); además se ha reportado que la 5-HT en células bovinas vasculares pulmonares de músculo liso aumenta la concentración de EROS mediante la activación de la NADPH oxidasa (Pérez-Vizcaino y cols, 2010).

Un buen número de evidencias científicas indican que el estrés oxidativo contribuye a la patogénesis de la HAP resultado de la suma de factores como el aumento de la capacidad contráctil de las arterias pulmonares, proliferación y remodelación de las células endoteliales y del músculo liso y trombosis aunado a la disfunción endotelial que es un factor importante que contribuye a la fisiopatología de esta enfermedad (Rabinovitch, 2008) debido a que el estrés oxidativo disminuye la biodisponibilidad del NO. En este sentido, la regulación de varias fuentes de EROS se encuentran aumentadas durante la HAP, así como es el caso de la NOX, XO, la eNOS desacoplada y las alteraciones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Pérez-Vizcaino y cols, 2010).

Actualmente de acuerdo con algunas ideas se a considerar a la HAP como una enfermedad de origen sistémico y metabólico, ya que alteraciones globales de la insulina conducen a la aparición de HAP. También se ha descrito este efecto en pacientes con intolerancia a la glucosa, obesidad o incremento de su índice de masa corporal, además en pacientes hipertensos pulmonares se han detectado múltiples alteraciones mitocondriales incluyendo anormalidades específicas en las enzimas glicolíticas, alteraciones en la fisión/fusión, anormalidades en la dinámica mitocondria-retículo endoplásmico y en la producción de EROS mitocondriales (Fessel y cols, 2013).

La disminución de la dilatación dependiente de NO es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial. Existen múltiples evidencias de que la vasodilatación dependiente del endotelio es anormal en arterias de conducción y de resistencia en modelos animales con diabetes al igual que se observa en personas con diabetes. Diversas evidencias clínicas y experimentales identifican a la vía de señalización del NO como la responsable de la aparición

de la HP. En condiciones normales, el NO producido en las células endoteliales por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) induce vasodilatación a través del GMPc, además de que inhibe la proliferación de las células musculares lisas, la secreción de endotelina, la agregación plaquetaria y la activación y migración leucocitaria (Budhiraja y cols, 2004; Morrel y cols, 2009). En este sentido, estudios en modelos animales de HP han demostrado que la mutación que resulta en la inhibición de la eNOS determina la aparición de aumento en la presión arterial pulmonar (Klinger y cols, 2013). En paciente con HP se ha cuantificado una reducción de la expresión de la eNOS en los tejidos pulmonares con la reducción esperada de NO (von Siebenthal y cols, 2016).

A nivel pulmonar, hemos reportado evidencias experimentales acerca de que el estrés oxidativo, producto de la hiperglucemia, conduce de manera notable a la aparición de la disfunción endotelial de arterias pulmonares, atenuando la relajación dependiente de NO endotelial debido a la disminución de la biodisponibilidad del NO. Entonces, la diabetes y la HP presentan en común una disminución de la biodisponibilidad de NO. En la circulación sistémica y pulmonar, la disminución del NO es atribuida al incremento del ion O.- generado por sobre-expresión de la NADPH oxidasa, enzima responsable en mayor proporción de la producción de O.- durante la diabetes (López-López y cols, 2008). La reducción de la biodisponibilidad por el incremento del estrés oxidativo también la hemos observado en modelos de hipertensión pulmonar persistente neonatal, donde la NADPH oxidasa y la ciclooxigenasa inducen incremento del estrés oxidativo y una reducción del efecto relajante del NO. Entonces la disfunción endotelial por el incremento del ion O.- representa el mecanismo potencial que vincula a la diabetes con la HP (López-López y cols, 2011; López-López y cols, 2012). Estos hallazgos de nuestro laboratorio, contribuyen a soportar la hipótesis de que la diabetes es un

factor de riesgo para la aparición de HP, aunque sin lugar a dudas solo se han dado los primeros pasos en la búsqueda de los mecanismos que subyacen a esta relación entre estas patologías incurables.

## **2. Antecedentes**

A nivel mundial, la diabetes presenta cada año un crecimiento muy importante en el número de casos diagnosticados, tan sólo en los Estados Unidos en el 2010, más de 21 millones de individuos contaban con diagnóstico de diabetes (CDC, 2011). Es plenamente aceptado que el tiempo de evolución de la enfermedad y el poco control de la misma, son factores que influyen de forma directa en la aparición de disfunción macro y microvascular sistémica que determina la aparición de las complicaciones crónicas propias de la diabetes como la nefropatía, retinopatía y neuropatía. El mecanismo común que comparten estas patologías es la presencia de disfunción endotelial (Brownlee, 2001). Los individuos que cursan con diabetes tienen mayor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares como infarto al miocardio y evento cerebro vascular entre otros. Sin embargo, sólo en los últimos años se ha iniciado el estudio del impacto de la diabetes sobre la vasculatura pulmonar. Estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes diabéticos presentan mayor riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar independiente de otras comorbilidades como arteriopatía coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva e hipertensión sistémica (Movahed y cols, 2005). Este hecho, sin duda tiene un fuerte impacto en la salud de estos pacientes paciente y en el costo de atención por parte de los sistemas de salud, ya que la atención de los pacientes con HP genera mayores costos de atención médica que un paciente sin la misma.

Desde el siglo pasado se conoce que la diabetes genera disfunción diastólica y sistólica ventricular izquierda pero fue hasta los primeros años de este siglo que se reportó que la diabetes también genera disfunción diastólica en el ventrículo derecho (Kosmala y cols, 2004; Fang y cols, 2003; Vinereanu y cols, 2003; Serrano y cols, 2014) y más recientemente con el avance en técnicas ecocardiográficas se ha agregado que también existe disfunción sistólica

(Parsaee y cols, 20012). Sin embargo, en las primeras observaciones, este hallazgo no fue considerado como un posible signo de la presencia de HP inducida por la DM. Actualmente, se conoce que pacientes que cursan con HP y DM presentan diferencias fisiológicas en la función del ventrículo derecho, con respecto a los que solo presentan HP, lo que señala la importancia de la DM en pacientes con HP (Abernethy y cols, 2015; Benson y cols, 2014; Grinnan y cols, 2016). El estudio de la relación entre DM y HP se considera importante, entre otras causas, debido a que se ha observado que la supervivencia de pacientes con HP que cursan también con diabetes es menor en relación a los pacientes sin diabetes, posiblemente por el daño en los mecanismos de respuesta adaptativa del ventrículo derecho (Benson y cols, 2014; Abernethy y cols, 2015). A partir de la evidencia clínica, diversos estudios experimentales se han dirigido hacia la búsqueda de los mecanismos que vinculan a ambas patologías, esto gracias al desarrollo de modelos animales experimentales. Entre los modelos animales que aportan un fuerte vínculo entre ambas entidades se encuentran el ratón macho apoE<sup>-/-</sup> que presenta resistencia a insulina y desarrolla HP, la cual por cierto es prevenida por rosiglitazona, un antidiabético (Hansmann y cols, 2007).

Por otra parte, nuestro grupo ha empleado un modelo de rata diabética inducida por estreptozotocina, el cual ha sido ampliamente utilizado para la investigación de los mecanismos involucrados en la génesis, evolución y complicaciones de la diabetes. En este modelo se ha demostrado la presencia de disfunción endotelial en arterias mesentérica, cerebrales, aorta y, en el 2008, reportamos que además presenta disfunción endotelial a nivel de la arteria pulmonar (López-López y cols, 2008; López-López y cols, 2008a). Esta característica del modelo animal es de gran relevancia debido al conocimiento de que la disfunción vascular caracterizada por un daño en la relajación vascular y/o hiperreactividad a



vasoconstrictores contribuye a la alta incidencia de enfermedades cardiovasculares en la diabetes y posiblemente al desarrollo de HP. Por otra parte, previamente se había observado en el mismo modelo la presencia de hipertrofia ventricular derecha (Al-Shafei y cols, 2002); pero de la misma forma como ocurrió en estudios clínicos en humanos, el hallazgo no fue considerado como una respuesta compensatoria del miocardio ante un incremento de la presión pulmonar. Sólo en los últimos años, se han establecido estudios dirigidos a la relación entre diabetes e HP.

Existen diversas estrategias farmacológicas recomendadas para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Sin embargo, resultan ser de baja especificidad hacia el lecho vascular pulmonar, y en muchos de los casos comprometen la presión sistémica. En el caso concreto de los inhibidores de la endotelina-1 que son más específicos a la circulación menor resultan ser de costos excesivamente elevados; por lo tanto, actualmente el sildenafil ha ganado terreno en este ámbito, ya que es un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), enzima responsable de la degradación GMPc a nivel de los cuerpos cavernosos del pene y a nivel del lecho vascular pulmonar; por lo tanto, el principal mecanismo de acción de este fármaco es el aumento de la concentración intracelular de éste mononucleótido cíclico favoreciendo que se mantenga activa la vía de señalización del NO a nivel del músculo liso vascular pulmonar, permitiendo la relajación muscular.

En la HAP, las evidencias científicas y los datos clínicos indican alteración de la vía del NO-GCs- GMPc por lo que recientemente el sildenafil ha sido aprobado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar primaria (Thakkar y cols, 2016; Pradhan y cols, 2016). Se ha descrito que la administración de sildenafil a dosis de 20-80 mg diarios por vía oral en

pacientes con HAP reduce la presión arterial pulmonar (Galié y cols, 2016) con pocas interacciones y no requiere de un seguimiento intensivo, por lo que es una alternativa atractiva en relación a otras estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. Otra evidencia es que en pacientes pediátricos, el sildenafil se ha usado para restaurar la HAP transitoria durante cirugía cardíaca (Brownlee y cols, 2004). Por otra parte, se ha encontrado que en pacientes diabéticos con enfermedad coronaria silente y disfunción eréctil los inhibidores de la PDE5 reducen la mortalidad y morbilidad cardiovascular (Gazzaruso y cols, 2008). De la misma manera, en modelos animales el sildenafil se ha empleado para reducir la HAP y el remodelamiento del ventrículo derecho de ratas tratadas con monocrotalina (MTC), en ratas con bandeo aórtico (Dai y cols, 2006) y en HAP hipóxica. En un modelo de lechón con HAP se ha encontrado que el sildenafil disminuye la presión pulmonar, corrige la hipertrofia de la capa media de la arteria pulmonar y corrige parcialmente los niveles de BMPRII asociados a la HAP (Rondelet y cols, 2004). Se ha observado también que el sildenafil reduce las alteraciones cardiovasculares inducidas por la hiperglucemia de animales insulino-resistente y diabéticos (Oudot y cols, 2010), y recientemente se han reportado varios efectos benéficos del sildenafil asociados sobre todo a la disminución del estatus oxidativo, esto tanto en humanos como en modelos animales (Cavalcanti y cols, 2016). En humanos con insuficiencia cardíaca, el sildenafil reduce el daño al miocardio en correlación a la disminución de marcadores de estrés oxidativo. A nivel experimental, se ha reportado que el sildenafil (40mg/kg/día) reduce la disfunción endotelial asociada al incremento de EROS en aorta de ratones knockout (Leal y cols, 2015) y en hipertensión renovascular disminuye la respuesta hipercontráctil a fenilefrina en lecho mesentérico asociado también a la disminución del estrés oxidativo (Fahning y cols, 2015).

### **3. Justificación**

La DM es una enfermedad metabólica que actúa como un factor de riesgo para desarrollar hipertensión arterial pulmonar. Esta enfermedad hasta el día de hoy es incurable y con un bajo pronóstico de vida. Para su tratamiento se han utilizado diversas estrategias farmacológicas, sin embargo, en muchas ocasiones resultan ser ineficaces o inespecíficas. Actualmente se emplean los inhibidores de la PDE5, ya que se ha descrito que favorecen la disminución de la presión pulmonar en modelos animales con hipertensión pulmonar inducida por monocrotalina, por insuficiencia cardíaca y por estrechamiento de la arteria pulmonar, al igual que en pacientes humanos con hipertensión pulmonar de origen distinto a la DM.

Por otra parte, en modelos animales de HAP, los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 disminuyen efectos secundarios a la HAP como la hipertrofia ventricular derecha y en humanos con insuficiencia cardíaca congestiva el sildenafil disminuye la expresión de la PDE5. Sin embargo, aún se desconoce si los efectos mencionados del sildenafil también se presentan en la hipertensión pulmonar originada por la DM. Tampoco se sabe si hay una sobreexpresión de la PDE5 en el corazón de sujetos con DME e HAP y si dicha expresión es modificada por el sildenafil.

#### **4. Hipótesis**

El sildenafil reduce la hipertensión arterial pulmonar en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.

## **5. Objetivos**

### **5.2. General**

Evaluar el efecto del sildenafil sobre la hipertensión arterial pulmonar inducida por la diabetes.

### **5.3. Particulares**

- 1) Evaluar el efecto del sildenafil sobre la presión arterial pulmonar de ratas diabéticas.
- 2) Evaluar el efecto del sildenafil sobre la función vascular.
  - a) Al inducir disminución del tono vascular con acetilcolina.
  - b) Al inducir aumento del tono vascular con 5-HT.
- 3) Evaluar el efecto del sildenafil sobre los cambios en la hipertrofia Ventricular Derecha de animales diabéticos bajo tratamiento con sildenafil.
- 4) Evaluar el efecto del sildenafil sobre la expresión de la proteína PDE5 en el corazón con hipertrofia ventricular derecha.

## **6. Metodología**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprawe-Dawley con un peso de 200 gramos que se dividieron en cuatro grupos: CTRL, CTRL/SILD, DM y DM/SILD. A la población de cada grupo se les monitoreó el peso corporal, la glucosa sanguínea y la presión sistémica al inicio y al final del modelo experimental. La DM se indujo con la administración única de 60 mg/Kg/ vía intraperitoneal (I.P) de estreptozotocina diluida en agua; 48 horas posterior a la inyección se determinó la glucosa sanguínea, los animales que presentaron valores  $\geq 350$ mg/dL fueron considerados diabéticos. En los grupos indicados, se les administró sildenafilo vía oral (V.O.) a una dosis de 20 mg/Kg/día/8 semanas. Durante el periodo experimental, todos los animales tuvieron agua y alimento *ad libitum*, periodos de luz-obscuridad de 12 por 12 horas y resto de requerimientos marcados en la NOM-062-ZOO-1999 referente al uso y manejo de animales de laboratorio.

### **6.1. Presión arterial sistémica**

El método aplicado para la determinación de presión sistémica se basa en la técnica esfigmomanométrica utilizada para medir la presión arterial en humanos. El equipo (NIBP Systems, ADInstruments) está equipado con un mango (cuff), que sirve para ocluir el paso de sangre; así como un transductor (PowerLab 4/35, ADInstruments) que sirve para seguir la evolución del pulso a lo largo de la medición.

Para medir la presión sistólica se coloca la cola de la rata dentro del mango, se infla el cuff hasta que desaparezca la señal del pulso debido a la obstrucción de la vena. Una vez detectada la desaparición de la señal, el cuff se desinfla automáticamente y la presión sistólica corresponde entonces a la presión del mango en la que empieza a reaparecer el pulso.

## **6.2. Presión arterial pulmonar**

Para este fin y al término de las 8 semanas, los animales fueron anestesiados vía I.P con una mezcla de Ketamina-Xilacina (60 y 4 mg/Kg, respectivamente). A continuación, se procedió a rasurar la zona frontal derecha de su cuello y quirúrgicamente a disecar la vena yugular; posteriormente, se realizó la canulación de la vena con un catéter umbilical de 3.5 FR. El catéter fué desplazado poco a poco hasta alcanzar la aurícula derecha, después el ventrículo derecho y por último la arteria pulmonar. Un indicador de que se está registrando la presión pulmonar es que la presión diastólica es diferente a 0 mmHg. El catéter se mantuvo conectado a un transductor de presión (AD INSTRUMENTS MLT0380/A) acoplado a un amplificador (CIDES AMPLIFICADOR DCT001). La señal generada fue enviada y almacenada en una computadora con la ayuda del software LabChart 7.0.

También obtuvimos la presión de pulso que es la diferencia entre la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica y es un indicador de la distensibilidad arterial.

## **6.3. Obtención y preparación de tejidos**

Se realizó la disección de los pulmones, de los cuales cuidadosamente se extrajo la arteria pulmonar del lóbulo izquierdo, a partir de la cual se obtuvieron anillos arteriales de 3 mm de longitud con endotelio integro, los cuales se montaron entre dos alambres de acero inoxidable en forma de L sujetos uno a un soporte anclado a una copa de Ahllin con 5 mL de solución Krebs-Henselleit, y el segundo sujeto a un transductor de tensión (GRASS FT-03) acoplado a un amplificador (GRASS 7-DAJK). Una vez montado el tejido, se lavó al menos 3 veces con solución Krebs-Henseleit a 37°C y se realizó el registro de tensión isométrica con una carga de 0.75 gramos. Para evaluar la presencia de endotelio, se aplicó la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>)

de fenilefrina para pre-contrair el músculo, y una vez que la respuesta alcanzó un estado estable, se aplicó una concentración de  $1e^{-6}$  de Ach (Yoopan y cols, 2008), la respuesta relajante igual o mayor a 50% respecto a la tensión generada por la concentración de fenilefrina fue considerada como indicador de la presencia de endotelio. La solución Krebs-Henseleit tuvo la siguiente composición: NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM y C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11 mM. Para mantener los requerimientos de oxígeno y pH del tejido se burbujeó con una mezcla de 95 % O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (Carbógeno) a un flujo moderado.

## **6.4. Ensayo de reactividad vascular**

### **6.4.1. Curvas de concentración-respuesta a Ach**

Previo a la construcción de la curva, a los anillos arteriales de todos los grupos estudiados se les indujo a precontracción con una concentración de  $1e^{-7}$  M de fenilefrina, al observar el efecto máximo y estable se inició la curva concentración-respuesta acumulativa de Ach desde  $1e^{-9}$  hasta  $3e^{-5}$  M. Los resultados obtenidos en esta curva se expresaron en porcentaje tomando como el 100% la tensión generada por la fenilefrina.

En los anillos arteriales pulmonares a los que se les evaluó la respuesta relajante a Ach en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y de apocinina (APO) se realizó el siguiente protocolo: posterior a la pre contracción con fenilefrina  $1e^{-7}$  M se colocó SOD (100U/mL) o APO (300 $\mu$ M) y tres minutos después se realizó la curva concentración-respuesta acumulativa de Ach desde  $1e^{-9}$  hasta  $3e^{-5}$  M. Los resultados obtenidos en esta curva se expresaron en porcentaje tomando como el 100% la tensión generada por la fenilefrina.



#### 6.4.2. Curvas de concentración-respuesta a 5-HT

Previamente a la construcción de las curvas, los anillos arteriales de todos los grupos estudiados fueron expuestos a una concentración de 80 mM de KCl, en el cual se observó la respuesta contráctil máxima que puede generar el músculo liso. Posteriormente, se realizó el lavado del KCl con solución Krebs-Henseleit, con lo cual la tensión regresó a su estado basal; 30 minutos después se realizó la curva de concentración-respuesta acumulativa a 5-HT desde  $1e^{-9}$  hasta  $3e^{-5}$  M. Los resultados obtenidos en esta curva se expresaron en porcentaje tomando como el 100 % la tensión generada por el KCl.

#### 6.4.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media para un determinado número de anillos arteriales pulmonares (n) de los distintos animales. Las curvas concentración-respuesta acumulativas para Ach y para 5-HT se ajustaron mediante el programa de análisis de datos Origin 8.5 con la siguiente ecuación logística.

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + e^{-k*([fármaco]-pD2)}}$$

Donde:

**E** es el efecto del fármaco.

**E<sub>max</sub>** es el efecto máximo (un índice de la eficacia relativa del agente vasoactivo), que se expresa como porcentaje de la respuesta contráctil inicial.

**k** es un factor que representa la pendiente de la curva.

**pD2** es la concentración de fármaco necesaria para obtener un 50 % del E<sub>max</sub>, expresada como el logaritmo negativo de dicha concentración (índice de la potencia del agente vasoactivo).

Estos parámetros fueron calculados a partir del ajuste de las curvas concentración-respuesta para cada experimento. Para el tratamiento estadístico se utilizó el paquete informático Origin 8.5. El análisis estadístico entre los datos de los grupos control y los grupos problema, se realizó utilizando la prueba t de Student para datos pareados y el nivel de significancia elegido fue de  $p < 0.05$ .

## **6.5. Índice Fulton**

El índice Fulton es un indicador de la presencia de hipertrofia ventricular derecha (Itoh y cols, 2004). Después del sacrificio del animal se extrajo el corazón, limpió perfectamente de sangre y se le retiraron las aurículas y grandes vasos; se separaron el ventrículo derecho del ventrículo izquierdo más septum siguiendo el tejido papilar y posteriormente se pesaron. El cociente del peso en gramos del ventrículo derecho sobre el ventrículo izquierdo más septum (VD/VI+S) fue considerado como el indicador de la presencia de hipertrofia ventricular derecha.

## **6.6. Evaluación de la expresión de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5)**

### **6.6.1. Western blot**

La evaluación se realizó en corazones de cada grupo experimental. Tanto las arterias pulmonares como los ventrículos derechos fueron disectados, e inmediatamente después fueron pesados y colocados en buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.25%, NaCl 150mM) con una relación de 3 mL de detergente por gramo de tejido + 3  $\mu$ L de inhibidor de proteasas (1:100) que con ayuda de una perla de tungsteno de 2 mm de diámetro se disgregaron los tejidos en el Tissue Lyser II (Quiagen, ID: 85300) a una frecuencia de 20 Hz por dos ciclos durante dos minutos cada uno, se incubó por 30 minutos a 4°C con agitaciones periódicas, transcurrido el tiempo se centrifugó a 10,000 rpm, se recuperó el

sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína total por un método colorimétrico (Bio-Rad, Protein Assay Kit) y se realizaron las lecturas en un equipo para microplaca (Synergy 4, BioTeK).

El Western Blot se realizó con 100 µg de proteína total de corazón. Se realizó SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) usando el método de Laemmli en un sistema de mini-gel (Bio-Rad, Mini-Protean). Las muestras de los diferentes grupos fueron corridas en paralelo.

### **6.6.2. Quimioluminiscencia**

Las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, con poro de 2 nm) con ayuda de una fuente de poder (Bio-Rad, PowerPac HC) a 90 mA, durante 16 horas, para identificar a la PDE5 las membranas fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-PDE5 (Abcam, ab14672) (1:1000) durante toda la noche a 4°C, y después con un anticuerpo secundario anti-conejo etiquetado con peroxidasa de rábano (Abcam, ab205718) (1:2000) durante dos horas a temperatura ambiente. Se utilizó como proteína endógena a la  $\beta$ -actina detectada con un anticuerpo policlonal de ratón anti- $\beta$ -actina (mAbcam 8226) (1:2000) y después con un anticuerpo anti-ratón (Abcam, ab6789) (1:4000) bajo las mismas condiciones que la PDE5. Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (Luminol; Millipore, Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL)) y se cuantificaron usando un software de análisis de imagen (Li-COR, C-Digit blot scanner). Los resultados se expresaron en porcentaje respecto a la expresión relativa de  $\beta$ -actina.

## 7. Resultados

### 7.1. El modelo experimental

Nuestro modelo de DM presentó una disminución significativa de peso respecto al grupo CTRL ( $227 \pm 28$  vs  $292 \pm 13$ , respectivamente), misma que se mantuvo en el grupo DM/SILD ( $221 \pm 24$ ). Por otra parte, no se observó diferencia significativa en el grupo CTRL/SILD respecto el grupo CTRL ( $303 \pm 16$  vs  $292 \pm 13$ , respectivamente) (Tabla 2) haciendo evidente que el sildenafil no altera los valores de peso. De la misma manera se observó un aumento significativo en la glucemia de los animales del grupo DM ( $503 \pm 20.8$ ) respecto al grupo CTRL ( $112 \pm 6$ ), misma que se mantuvo durante el tratamiento con sildenafil del grupo diabético ( $455 \pm 17.3$ ). Al comparar el valor de glucemia del grupo CTRL/SILD ( $99 \pm 2$ ) respecto al valor de glucemia del grupo CTRL no se observó diferencia estadísticamente significativa (Tabla 2), por lo que este inhibidor de la PDE5 tampoco modifica los valores de glucosa en sangre.

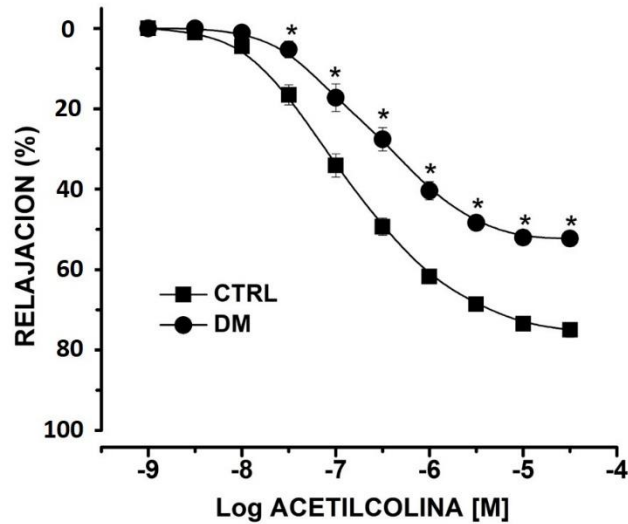
Al evaluar la presión arterial sistémica encontramos que los animales del grupo CTRL tuvieron un valor de  $100 \pm 3$  mmHg, los del grupo CTRL/SILD una presión de  $102 \pm 1.5$  mmHg, los del grupo DM una presión de  $99 \pm 5.4$  mmHg y los del grupo DM/SILD una presión de  $97 \pm 6.6$  mmHg (Tabla 2), por lo que al no observar diferencia estadísticamente significativa en ningún grupo respecto a los controles, se hace evidente que nuestro modelo diabético no es hipertenso sistémico y que el sildenafil no modifica los valores de dicha presión.

	GRUPO			
	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
PESO (gr)	292 ±13	303 ± 16	227 ± 28*	221 ± 24 <sup>†</sup>
GLUCOSA (mg/dL)	112 ± 6	99 ±2	503 ± 20.8*	455 ±17. 3 <sup>†</sup>
PAS (mm Hg)	100 ± 3	102 ± 1.5	99 ± 5.4	97 ± 6.6

**Tabla 2. Datos de nuestro modelo experimental.** Valores de peso, glucosa y presión arterial sistémica (PAS) de los grupos experimentales. Los resultados se presentan como la media ± EEM. \* $p < 0.05$  respecto al grupo control y  $^{\dagger}p < 0.05$  respecto al grupo control tratado con sildenafil.

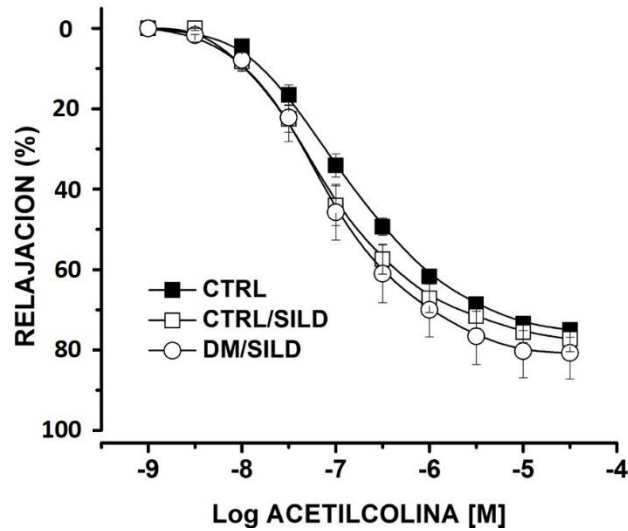
## 7.2. Efecto de la diabetes sobre la relajación dependiente de óxido nítrico inducida por Ach

En esta serie experimental, se validó sí en el modelo empleado, la DM genera disfunción endotelial como se ha reportado previamente. En los experimentos realizados durante el desarrollo de ésta tesis, se observó a partir de las curvas concentración-respuesta, que la Ach induce una respuesta vasorelajante dependiente de la concentración. El análisis de las curvas de concentración-respuesta indicó la presencia de disfunción endotelial en el grupo DM caracterizado por una disminución en el efecto relajante mediado por NO e inducido por Ach (Figura 24). El Emax del grupo control fue de  $74.82 \pm 1.86\%$  mientras que en el grupo DM fue de  $53.3 \pm 2.38\%$  (Tabla 3). No se observaron cambios significativos entre los valores de la  $pD_2$  obtenidos en los grupos estudiados. La  $pD_2$  para el grupo control fue de  $6.92 \pm 0.72$ , y para el grupo DM fue de  $6.12 \pm 0.147$  (Tabla 3).



**Figura 24. La diabetes induce disfunción endotelial.** Anillos arteriales pulmonares control (CTRL) y diabéticos (DM) son pre contraídos con fenilefrina y relajados con acetilcolina y los resultados de la respuesta relajante son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto a los anillos control.

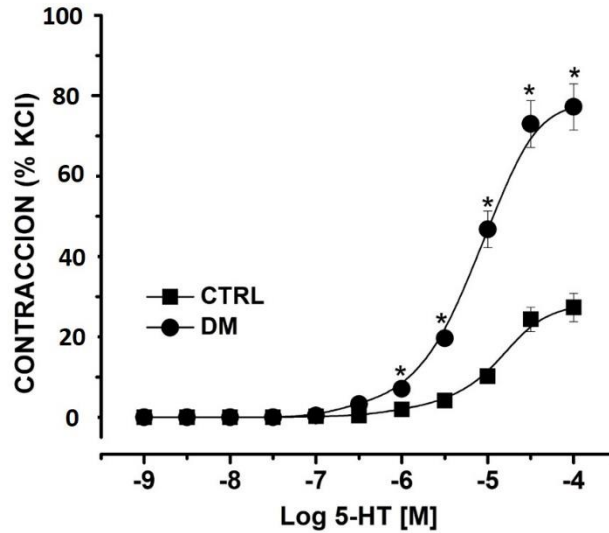
En consecuencia, de los datos mencionados en el apartado anterior, se estudió el efecto de favorecer la vía de señalización del NO sobre la disfunción endotelial inducida por la DM. En las curvas concentración-respuesta a Ach realizadas a partir del grupo DM tratado con sildenafil, se observó la ausencia de cambios significativos en la relajación mediado por NO e inducido por Ach respecto a los datos obtenidos de las curvas concentración-respuesta con los grupos CTRL y CTRL/SILD; es decir el tratamiento con sildenafil en el grupo DM evitó la aparición de disfunción endotelial a nivel de la arteria pulmonar (Figura 25). El Emax para el grupo control fue de  $74.82 \pm 1.86\%$ , en grupo CTRL/SILD fue de  $77.5 \pm 3.12\%$  y en el grupo DM fue de  $53.3 \pm 2.38\%$  (Tabla 3). No se observaron cambios significativos entre los valores de la  $pD_2$  obtenidos en los grupos estudiados. La  $pD_2$  para el grupo control fue de  $6.92 \pm 0.79$ ; para el grupo CTRL/SILD fue  $6.64 \pm 0.12$  y para el grupo DM fue de  $6.12 \pm 0.14$  (Tabla 3).



**Figura 25. El sildenafil evita la disfunción endotelial diabética.** Anillos arteriales pulmonares control (CTRL), control tratados con sildenafil (CTRL/SILD) y diabéticos tratados con sildenafil (DM/SILD) son pre contraídos con fenilefrina y relajados con acetilcolina. No se presenta diferencia significativa de la curva CTRL/SILD respecto a la curva CTRL, así como tampoco en la curva DM/SILD respecto a la curva CTRL/SILD.

### 7.3. Efecto del sildenafil sobre la hiperrespuesta contráctil a 5-HT de la arteria pulmonar

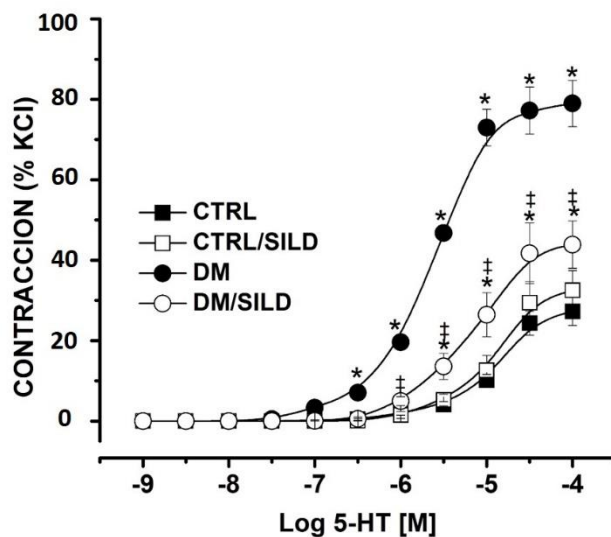
En esta serie experimental, se observó a partir de las curvas de concentración-respuesta que la 5-HT induce una respuesta contráctil dependiente de la concentración (Figura 26). El análisis de las curvas concentración-respuesta indicó que la DM induce un incremento del Emax de la respuesta contráctil a 5-HT en el grupo DM con respecto al grupo control (Tabla 3). El Emax del grupo control fue de  $59.5 \pm 4.25\%$  mientras que en el grupo DM fue de  $92.929 \pm 5.78\%$ . No se observaron cambios significativos entre los valores de la  $pD_2$  de los grupos estudiados. La  $pD_2$  para el grupo control fue de  $5.4 \pm 0.074$ , mientras que para el grupo DM fue de  $5.6 \pm 0.21$  (Tabla 3).



**Figura 26. La diabetes induce hiperrespuesta contráctil a la serotonina.** Anillos arteriales pulmonares con endotelio intacto de los grupos control (CTRL) y diabético (DM) son contraídos con serotonina (5-HT). Los resultados de la respuesta relajante son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  de la curva DM respecto a la curva CTRL.

El incremento de la respuesta contráctil a 5HT observado en preparaciones del grupo DM fue analizada en arterias del grupo DM/ SILD. Se observó una disminución significativa en el Emax de la respuesta contráctil en el grupo diabético tratado con sildenafil respecto al grupo DM (Figura 27); se observaron cambios significativos en el Emax entre los grupos CTRL, CTRL/SILD y el grupo DM, así como también una disminución significativa en el grupo DM/SILD respecto al grupo DM (Tabla 3). El Emax para el grupo control fue de  $59.5 \pm 4.25\%$ , para el grupo CTRL/SILD fue de  $58.7 \pm 5.913\%$ , y en preparaciones del grupo DM/SILD fue de  $69.267 \pm 1.86\%$ . No se obtuvieron cambios significativos en los valores de pD2 entre los grupos estudiados. El valor obtenido para el grupo control fue de  $5.4 \pm 0.074\%$ , para el grupo CTRL/SILD fue de  $5.4 \pm 0.085\%$ , y de  $5.7 \pm 0.22\%$  en el grupo DM/SILD (Tabla 3).





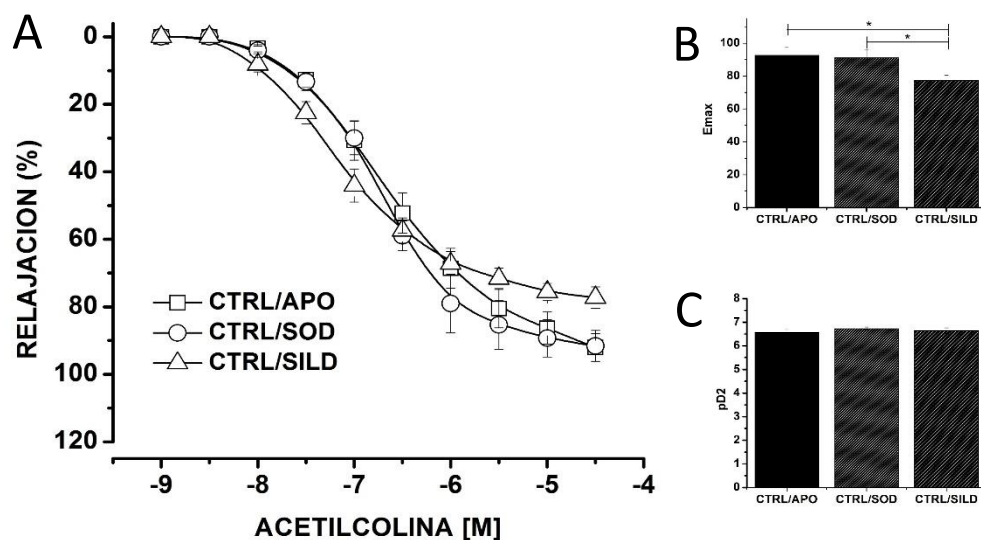
**Figura 27. El sildenafil disminuye la hiperrespuesta contráctil a serotonina.** Respuesta contráctil a la serotonina de anillos arteriales pulmonares de nuestros cuatro grupos experimentales. Los resultados de la respuesta relajante son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto a la curva control (CTRL) y  $^{\dagger}P < 0.05$  respecto a la curva de anillos diabéticos (DM).

CDR Ach				
	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
<b>pD2</b>	6.92 $\pm$ 0.79	6.64 $\pm$ 0.122	6.12 $\pm$ 0.147	6.61 $\pm$ 0.097
<b>E<sub>max</sub></b>	74 $\pm$ 1.8	77 $\pm$ 3.1	53 $\pm$ 2.3*	81 $\pm$ 7
CDR 5-HT				
	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
<b>pD2</b>	5.4 $\pm$ 0.074	5.4 $\pm$ 0.085	5.6 $\pm$ 0.21	5.7 $\pm$ 0.22
<b>E<sub>max</sub></b>	59 $\pm$ 4.3	58 $\pm$ 5.9	92 $\pm$ 5.7*	69 $\pm$ 1.8 <sup>†</sup>

**Tabla 3. Efectos máximos y pD2.** Los datos de E<sub>max</sub> y el Log de la dosis efectiva 50 (pD2) fueron calculados para una de las curvas construidas ya sea con acetilcolina o serotonina. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto al valor del grupo control.  $^{\dagger}P < 0.05$  respecto al valor del grupo control tratado con sildenafil.

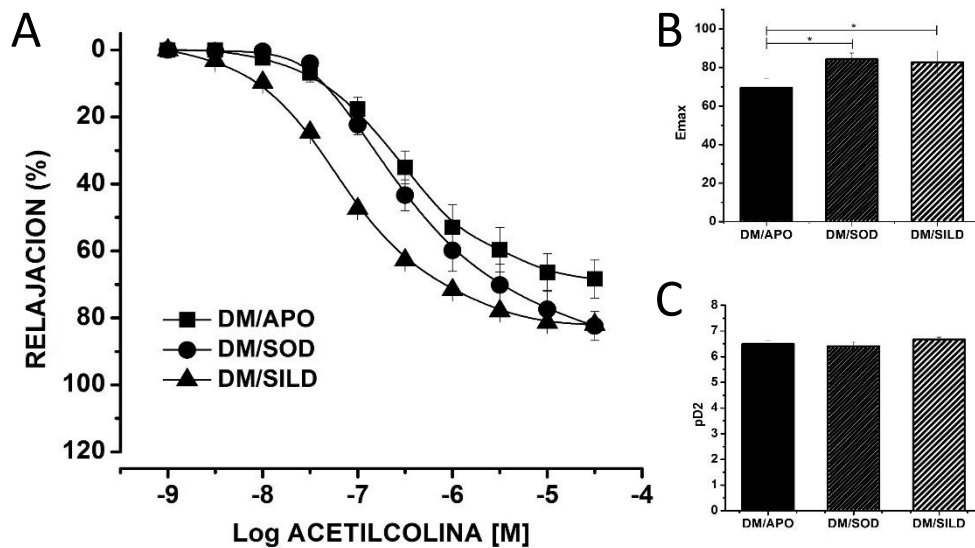
#### **7.4. Efecto del sildenafil sobre el estrés oxidativo de la arteria pulmonar en la diabetes mellitus**

El primer bloque de resultados descritos aquí, apunta a que el sildenafil administrado en el grupo de animales con diabetes, evita la aparición de disfunción endotelial de la arteria pulmonar. La disfunción ha sido atribuida al incremento del estatus oxidativo producto del incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> proveniente mayoritariamente de la NADPH oxidasa. Para evaluar el posible papel del sildenafil sobre el estatus oxidativo, se realizaron en el grupo CTRL curvas concentración-respuesta a acetilcolina en presencia de superóxido dismutasa, un agente escavenger de O<sub>2</sub><sup>-</sup>; en presencia de un inhibidor de NADPH oxidasa y se compararon con la curva obtenida con sildenafil. El comportamiento de la curva concentración-respuesta a Ach en preparaciones del grupo CTRL al cual se administró sildenafil, fue similar a la obtenida con APO o SOD en la preparación *in vitro* en preparaciones del grupo CTRL, el cual no fue administrada con sildenafil (Figura 28). Se observaron cambios significativos en el Emax pero no así en la pD<sub>2</sub> entre los grupos mencionados (Figura 28). El Emax para el grupo CTRL/SILD fue de  $77.5 \pm 3.12\%$ , para el grupo CTRL/APO fue de  $92.68 \pm 4.87\%$ , y en el grupo CTRL/SOD fue de  $91.21 \pm 4.97\%$ . En el caso de la pD<sub>2</sub>, CTRL/SILD fue de  $6.64 \pm 0.12\%$ , para el grupo CTRL/APO fue de  $6.57 \pm 0.12\%$ , y en el grupo CTRL/SOD fue de  $6.729 \pm 0.056\%$  (Figura 28).



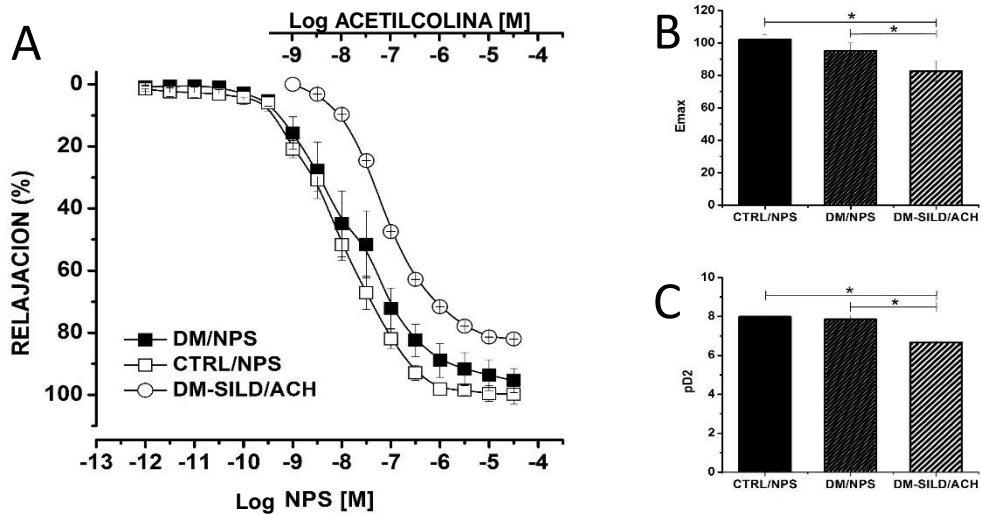
**Figura 28. Efecto control del sildenafil respecto a otras terapias antihipertensivas.** A) Anillos arteriales pulmonares del grupo control fueron pre contraídos con fenilefrina y relajados con acetilcolina. B) Efectos máximos de cada una de las curvas. C) pD2 para cada una de las curvas. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto a los anillos control.

La misma estrategia experimental fue llevada al cabo en el caso de las preparaciones obtenidas de los grupos DM y DM/SILD. Los resultados obtenidos en estos grupos con incremento del estatus oxidativo, fueron similares a los obtenidos en condiciones de bajo estatus oxidativo (CTRL). Es decir, la administración de sildenafil en el grupo DM evita la aparición de disfunción endotelial de forma similar a como lo hace la inhibición de la fuente que genera el estatus oxidativo y/o el agente oxidante (Figura 29). El Emax para el grupo DM/SILD fue de  $82.53 \pm 6.10\%$ , para el grupo DM/APO fue de  $69.38 \pm 5.06\%$ , y en el grupo DM/SOD fue de  $84.19 \pm 3.38\%$ . En el caso de la PD2, DM/SILD fue de  $6.65 \pm 0.094\%$ , para el grupo DM/APO fue de  $6.48 \pm 0.32\%$ , y en el grupo DM/SOD fue de  $6.39 \pm 0.17\%$  (Figura 29).



**Figura 29. Eficacia del sildenafil respecto a otras terapias antihipertensivas pulmonares durante la diabetes.** A) Anillos arteriales pulmonares del grupo diabético fueron pre contraídos con fenilefrina y relajados con acetilcolina. B) Efectos máximos de cada una de las curvas. C) pD2 para cada una de las curvas. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. \*P<0.05 respecto a los anillos control.

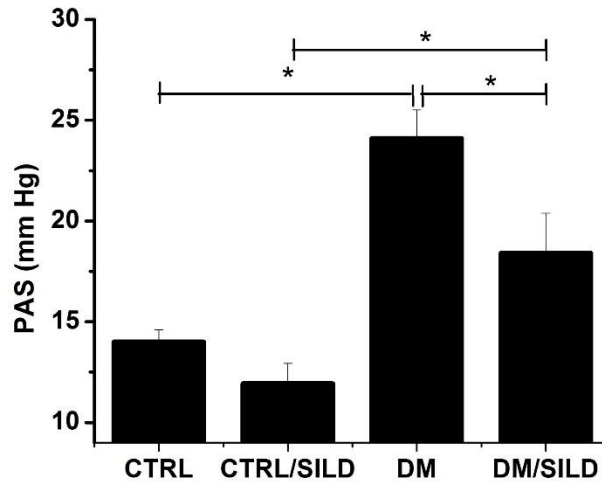
Por otra parte, se realizaron curvas concentración-respuesta a NPS, un donador intracelular de NO; esta estrategia experimental evalúa la viabilidad de la vía de señalización del NO. Los resultados mostrados en la figura 30 indican que, en el modelo de diabetes empleado, no se presentaron cambios en la vía del NO, ya que ambas curvas, del grupo control y DM, son semejantes, sin cambios en el Emax ni en la pD2 (Figura 30). En la misma gráfica se muestra el inserto de la curva a Ach del grupo DM/SILD, la cual muestra un menor Emax y un desplazamiento a la derecha en relación a las de NPS.



**Figura 30. Eficacia del sildenafil respecto al NPS.** A) Anillos arteriales pulmonares del grupo control y diabético fueron precontraídos con fenilefrina y relajados con nitroprusiato de sodio y arterias pulmonares del grupo diabético tratado con sildenafil (DM-SILD) fueron relajados con acetilcolina. B) Efectos máximos de cada una de las curvas. C) pD2 para cada una de las curvas. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. \* $P < 0.05$  respecto a la relajación con NPS.

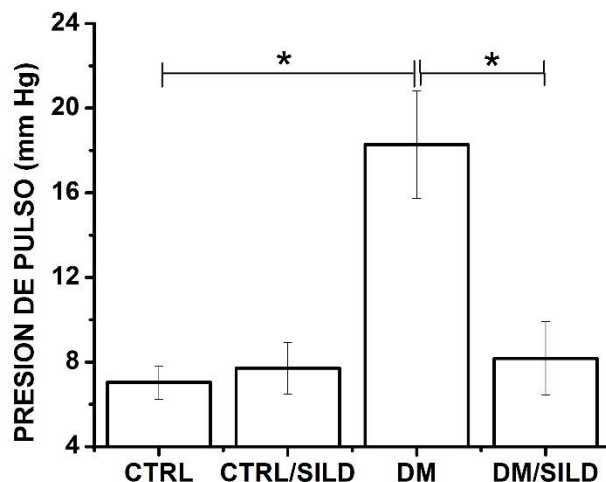
## 7.5. Presión arterial pulmonar

Al término de las 8 semanas experimentales, en las ratas de los grupos DM y DM/SILD se observó un incremento significativo de la presión sistólica pulmonar con respecto al grupo CTRL y CTRL/SILD. En el caso del grupo DM/SILD la presión sistólica fue menor significativamente respecto al valor obtenido en el grupo DM, es decir el sildenafil disminuye el aumento de presión arterial pulmonar inducido por DM. La presión arterial pulmonar sistólica fue de  $14.002 \pm 0.59$  mmHg en el grupo control;  $11.94 \pm 0.98$  mmHg en el grupo CTRL/SILD;  $24.106 \pm 1.407$  mmHg en el grupo DM y de  $18.41 \pm 1.96$  mmHg en el grupo DM/SILD (Figura 31).



**Figura 31. El sildenafil disminuye la presión arterial pulmonar durante la diabetes.** Valores de presión arterial pulmonar sistólica de todos nuestros grupos experimentales. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ EEM \* $p < 0.05$ .

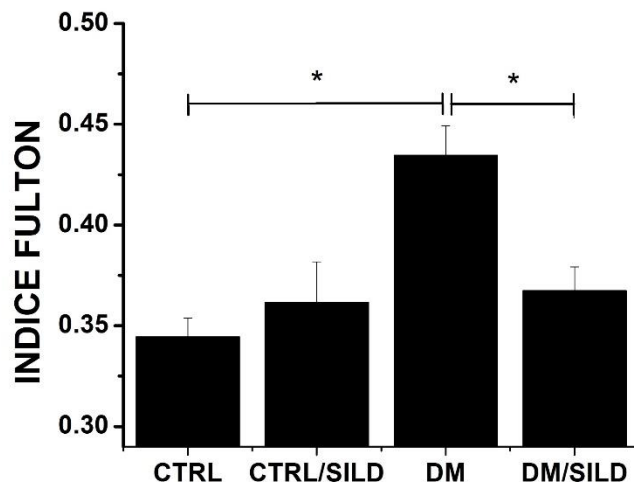
Además de forma similar se observó que la presión de pulso pulmonar en el grupo DM fue mayor significativamente respecto al grupo CTRL. Este efecto no se presentó en el grupo DM/SILD. Es decir, el sildenafil evita el incremento de la presión de pulso pulmonar durante la DM. La presión de pulso pulmonar sistólica fue de  $7.02 \pm 0.78$  mmHg en el grupo control;  $7.71 \pm 1.21$  mmHg en el grupo CTRL/SILD;  $18.27 \pm 2.55$  mmHg en el grupo DM y de  $8.17 \pm 1.73$  mmHg en el grupo DM/SILD (Figura 32).



**Figura 32.** El sildenafil disminuye la presión de pulso arterial pulmonar durante la diabetes. Valores de presión de pulso arterial pulmonar de todos nuestros grupos experimentales. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ EEM \* $p < 0.05$ .

### 7.6. Índice Fulton

En estos experimentos se analizó la presencia de hipertrofia del ventrículo derecho como un indicador de la respuesta cardíaca compensatoria a la presencia de HAP durante la DM. El valor del índice Fulton fue mayor significativamente en el grupo DM respecto al grupo CTRL y CTRL/SILD. Sin embargo, en el grupo DM/SILD no se presentó diferencia significativa respecto a los grupos CTRL y CTRL/SILD, es decir, ante la administración del sildenafil durante la diabetes, se evitó la respuesta compensatoria del ventrículo derecho. El valor de índice Fulton fue de  $0.34 \pm 0.0092$  en el grupo control;  $0.36 \pm 0.02$  en el grupo CTRL/SILD;  $0.43 \pm 0.014$  en el grupo DM y de  $0.36 \pm 0.011$  en el grupo DM/SILD (Figura 33).

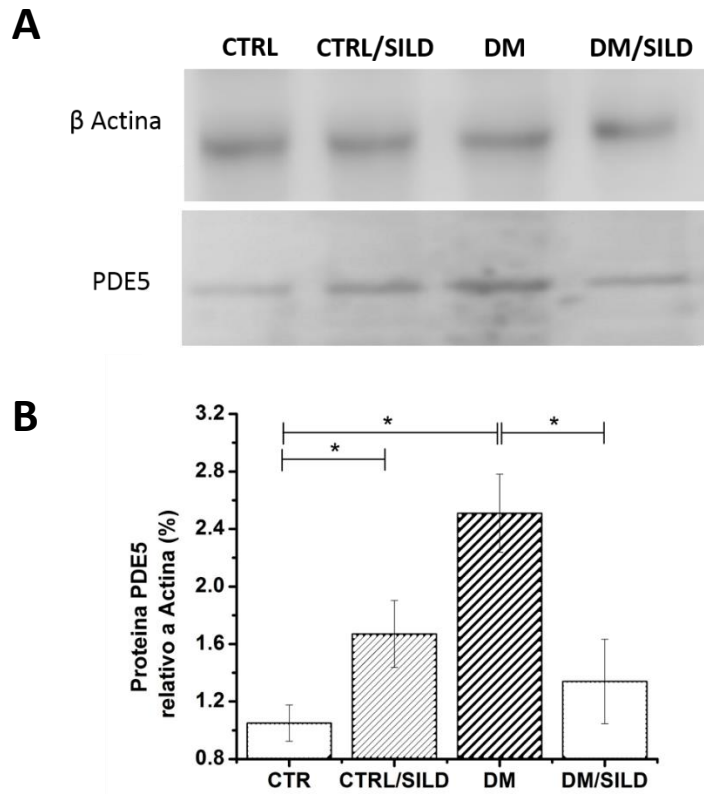


**Figura 33. El sildenafil evita la hipertrofia ventricular derecha.** Resultado del índice Fulton para cada grupo experimental. Los resultados se presentan como la media  $\pm$ EEM \* $p$ <0.05

### 7.7. Expresión de la fosfodiesterasa tipo 5

En el Western blot usando un anticuerpo dirigido contra la PDE5 de rata, se detectó una banda de aproximadamente 93 kD de los extractos de proteínas totales de corazones de nuestros cuatro grupos experimentales (Figura 34A). Consistente con la presencia de DM se observó el aumento significativo en la expresión de la enzima PDE5, respecto al grupo CTRL. Por otra parte, también se observó una disminución significativa en la expresión de esta proteína en el grupo DM/SILD respecto al grupo DM, es decir, el sildenafil evitó la sobreexpresión de la PDE5 en corazones diabéticos. También es importante mencionar que se observó un aumento significativo en la expresión de la PDE5 en el grupo CTRL/SILD respecto al CTRL (Figura 34B). El valor de la expresión de la PDE5 relativo a la actina para el grupo CTRL fue de  $1.05 \pm 0.12\%$ , para el grupo CTRL/SILD fue de  $1.67 \pm 0.23\%$ , para el grupo DM fue de  $2.51 \pm 0.27\%$  y para el grupo DM/SILD fue de  $1.34 \pm 0.29\%$  (Figura 34B).





**Figura 34. El sildenafil evita la sobreexpresión de la PDE5 durante la diabetes.** A) Western blot de la  $\beta$ -actina y de la enzima PDE5 en corazón, y expresión de la PDE5 relativa a  $\beta$ -actina en corazones de cada uno de nuestros grupos experimentales (B). Los resultados se presentan como la media  $\pm$ EEM  $*p < 0.05$

## **8. Discusión**

En la presente tesis de maestría se analizó la respuesta relajante de la acetilcolina y de la serotonina, que actúa como un agonista contráctil; en arterias pulmonares de ratas con DM experimental (DME) que recibieron un tratamiento con sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5. En esta sección se discutirá el desarrollo de la disfunción endotelial en los anillos arteriales pulmonares de ratas con DME, así como la “protección” del tratamiento con sildenafil de la reducción en relajación a acetilcolina y a la hipercontracción a la serotonina. Además, se expondrán los antecedentes bibliográficos en caminados a la explicación relacionada al incremento de la presión arterial pulmonar de las ratas con DME, así como la atenuación de dicho incremento por medio del tratamiento con el inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5. Por otra parte, discutiremos los efectos de la respuesta compensatoria a los distintos valores de presión pulmonar por parte del ventrículo derecho y al final, discutiremos el efecto del sildenafil sobre la expresión de la fosfodiesterasa tipo 5 en corazón durante la diabetes respecto al resto de los grupos experimentales.

### **8.1. Resultados relacionados con las ratas tratadas con estreptozotocina**

En nuestros experimentos utilizamos a la rata debido a su fácil reproducción y bajo costo en el mantenimiento, además es un roedor ampliamente utilizado para estudios de farmacología experimental (Hundahl y cols, 2017; Szkudelski, 2012; Vickers y cols, 2015). Otros animales de laboratorio como el conejo, perro, gato, cerdo, no se reproducen tan rápidamente o su mantenimiento es muy costoso, por lo tanto, se utilizan con menos frecuencia. Aunque el ratón tiene más o menos costos equivalentes en reproducción y mantenimiento, nosotros utilizamos a la rata por el tamaño de los pulmones que nos confiere una mayor facilidad en la obtención y manejo de los anillos arteriales. Cabe mencionar que los estudios para evaluar la

hipertensión arterial pulmonar, ya sea con monocrotalina o con hipoxia se han realizado en ratas (Karpuz y cols, 2017; Yu y cols, 2017; Neto-Neves y cols, 2017; Luo y cols, 2017). En la presente tesis, se utilizaron exclusivamente animales machos con el fin de minimizar la posible variabilidad entre sexos, en particular la diferencia dependiente de la modulación hormonal (Beery y Zucker, 2011; Yoon y cols, 2014).

En la literatura se describen diversos agentes que inducen modelos de diabetes experimental. Específicamente en ratas, es la estreptozotocina la que ha dado mejores resultados debido a que su especificidad es mayor a la del aloxano (Akbarzadeh y cols. 2007). El mecanismo por el cual la estreptozotocina destruye las células beta del páncreas no ha sido aclarado del todo, pero se propone que dicha sustancia se introduce a la célula  $\beta$  pancreáticas por medio del transportador GLUT2 causando la destrucción progresiva de estas células debido a la metilación del ADN, induciendo la muerte celular  $\beta$  en los islotes pancreáticos y entonces al no haber insulina suficiente para facilitar la entrada de glucosa en la célula, el nivel de glucemia aumenta. En nuestros animales de experimentación se presentó un aumento significativo en la concentración de glucosa sanguínea y una reducción en la ganancia de peso corporal, ambos indicadores de la generación del cuadro de DM experimental comparable con la diabetes tipo1 del humano.

Los valores de peso corporal obtenidos indican que en el grupo con DME puede ser la consecuencia de una mayor movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo, debido a una aceleración de la  $\beta$  oxidación hepática, y a la disminución de la enzima lipasa en el tejido adiposo cuando los niveles de insulina están disminuidos (Baumeier y cols, 2017; Lopez-Mejia y cols, 2017). Por otra parte, podría estar implicada la disminución de la síntesis de proteínas

en los tejidos, favoreciéndose la proteólisis, además de alteraciones del metabolismo lipídico, que conllevan a una disminución del peso (Akbarzadeh y cols. 2007; Uauy y cols, 2000). Al comparar los resultados obtenidos en cuanto a glucosa y peso para cada uno de los grupos experimentales, podemos observar que el sildenafil no tiene efecto sobre ninguno de estos dos parámetros, pues no se observó diferencia significativa tanto en el grupo control como en el grupo DM tratados con sildenafil respecto a su par no tratado, es decir este inhibidor de la PDE5 no modifica la bioquímica de la glucosa, ni los mecanismos involucrados en la ganancia o pérdida de peso. Datos semejantes se han observado con un modelo de ratas con diabetes tipo 2 (OLETF) donde el tratamiento con sildenafil no modificó el peso, ni la concentración de glucosa sanguínea (Kuno y cols. 2011).

Los efectos hasta ahora discutidos podrían ser resultado de la acción directa de la estreptozotocina. Sin embargo, existen varias razones para considerar que los resultados son debidos a la hiperglucemia y no de una acción propia de la estreptozotocina. Se ha descrito que, con el mismo modelo animal, las células aisladas del miocardio ventricular, se presenta una disminución de la corriente transitoria de salida acarreada por potasio ( $I_{to}$ ). La corriente iónica se recupera después de que las células son incubadas con insulina (Shimoni y cols. 1999). Por otra parte, aunque las arterias pulmonares de ratas tratadas con estreptozotocina presentan disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio, la vasodilatación independiente del endotelio (con un donador de NO) no mostró cambios. Además, las mismas preparaciones presentaron mayor capacidad de respuesta contráctil a fenilefrina (López-lópez y cols. 2008). Estudios recientes de nuestro laboratorio indican que la vasodilatación dependiente del endotelio disminuida en la diabetes es revertida por la incubación *in vitro* de los anillos arteriales con insulina (comunicación personal). Bajo este mismo sentido se ha

descrito que la estreptozotocina puede utilizarse para la inducción de la diabetes en modelos animales sin afectar de manera significativa mecanismos de transporte, metabolismo o interacciones moleculares (Srinivas, 2014).

Por otra parte, nuestro modelo animal, es un modelo diabético sin hipertensión arterial sistémica, ya que no se observó aumento significativo de la presión arterial sistémica en el grupo DM respecto al grupo CTRL, pero además es importante discutir que el sildenafil no modifica dichos valores de presión sistémica, lo cual sugiere especificidad del sildenafil sobre la circulación menor (discutido más adelante), en comparación a otras estrategias terapéuticas, que sí bien es cierto que disminuyen la hipertensión pulmonar, también comprometen la presión sistémica, como es el caso de los bloqueadores de los canales de calcio o donadores de NO.

## **8.2. Cambios en la reactividad vascular por el tratamiento con sildenafil**

Los estudios de relajación a Ach representan la prueba inicial del funcionamiento del endotelio (Dandan y cols, 2017). El efecto máximo, así como la concentración efectiva al 50% derivado de las curvas de concentración-respuesta son similares a los obtenidos por otros grupos de investigación que trabajaron con condiciones muy parecidas a las de nosotros (Christou y cols, 2017; Walch y cols, 2000). Este hecho se observó en los lotes control y con ratas tratadas con estreptozotocina. Está bien establecido que la relajación dependiente del endotelio evocada por la Ach inicia con la unión a receptores muscarínicos M3 endoteliales (Walch y cols, 2000) y la consecuente activación de una proteína Gq11 (Wilson y cols, 2016). Este hecho da lugar al incremento de la concentración de calcio intracelular, la activación del complejo calcio-calmodulina y el incremento de la síntesis de NO endotelial (Antosova y cols, 2017). Es

ampliamente referido que en las arterias pulmonares de animales y de humanos, el NO es el principal factor vasorelajante proveniente del endotelio (Singh y Evans, 1997), el cual activa a la GCs muscular (Hobbs e Ignarro, 1996). El incremento del GMPc y la activación de la proteína cinasa G dan lugar a la reducción del calcio intracelular con la consecuente reducción del tono vascular (Zhao y cols, 2015). Nuestro estudio no exploró este mecanismo, pero creemos que nuestros resultados con Ach se pueden explicar con base en lo descrito anteriormente.

La reducción en el efecto vasodilatador de la Ach que presentaron las preparaciones provenientes de las ratas diabéticas concuerda con los resultados de otros autores (Dandan y cols, 2017; Toque y cols, 2017), que proponen que dicha disfunción endotelial se relaciona con la reducción de la biodisponibilidad del NO. El alto nivel de estrés oxidativo que presentan los pacientes diabéticos (Cé y cols, 2011; Giugliano, 2012) y los modelos animales (Bertoluci y cols, 2015) con DME generan una “barrera química” para la difusión del NO con la consecuente pérdida o reducción de la relajación. En este sentido, nuestros resultados se pueden interpretar de la misma forma puesto que han encontrado un incremento de los radicales O.- y un aumento de la expresión de la NADPH oxidasa (López-López y cols, 2008), la principal enzima que genera radicales O.- en el territorio vascular (López-López y cols, 2001).

Encontramos que el tratamiento con sildenafil en las arterias pulmonares presentan una relajación igual que las arterias pulmonares de las ratas control. La dosis que utilizamos para el tratamiento con sildenafil está en el rango de la utilizada por otros grupos que exploran el mecanismo fisiopatológico de la hipertensión pulmonar inducido con monocrotalina en ratas (Dai y cols, 2006; Galié y cols, 2005; Kuang y cols, 2010). El sildenafil es un activo oral, potente y selectivo inhibidor de la PDE tipo 5, que ejerce su efecto farmacológico aumentando

la concentración intracelular de GMPc; este fármaco ha resultado ser eficaz para los pacientes con HAP (Sastry y cols, 2004). El mecanismo de este efecto no está claro y se ha atribuido, al menos en parte, a su capacidad para inducir una vasodilatación (Ghofrani y cols, 2002) debido a que una vez que el NO se encuentra a nivel intracelular en las CMLV activa a la GCs, la cual biotransforma al GTP en GMPc, el cual por diversos mecanismos favorece la relajación vascular, es decir, los efectos vasodilatadores pulmonares del NO están mediados a través del GMPc, que se degrada rápidamente por la PDE5 (Galie y cols, 2005). Al inhibir selectivamente la fosfodiesterasa tipo 5 con sildenafil se promueve la acumulación intracelular de GMPc y por lo tanto, se incrementa la vasodilatación mediada por NO (Tantini y cols, 2005).

Estudios en pacientes adultos con sildenafil demostraron que dicha terapia es efectiva en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar idiopática (Sastry y cols, 2004). Se ha utilizado al sildenafil para tratar la HAP en niños debido a su efecto sobre la relajación vascular, permitiendo un mejor flujo sanguíneo en la zona pulmonar (Juárez y cols, 2017). Actualmente, se han reportado otros efectos benéficos como la disminución del estatus oxidativo (Sikandaner y cols, 2017), la disminución de la formación de placas de ateroma (Balarini y cols, 2013) y disminución de la proliferación celular, así como la restauración de la función endotelial (Erdogan y cols, 2007).

La acción “protectora” contra la disfunción endotelial por parte del sildenafil que observamos en las arterias pulmonares de las ratas diabéticas puede estar relacionada con la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 y el subsecuente incremento del GMPc formado por la estimulación de la GCs por parte del NO que no fue “barrido” por los radicales O.-. Es decir que el efecto

“protector” del sildenafil es independiente del estatus oxidativo puesto que se ha descrito que las ratas con DME tienen incrementada la concentración de O.- (López-López y cols, 2008).

En los resultados sobre el análisis comparativo del efecto del sildenafil respecto a otras herramientas farmacológicas utilizadas para revertir la disfunción endotelial, encontramos que el inhibidor de la PDE5 tiene una eficacia semejante (0.02 veces menor) a la enzima antioxidante (SOD) y a la eficacia (0.19 veces mayor) del inhibidor de la principal enzima que genera radicales O.- en las arterias durante la HAP (APO) (Tabla 4). Este hecho confirma que la magnitud del efecto favorable del sildenafil sobre la disfunción endotelial es independiente al estatus oxidativo. Puesto que las ratas diabéticas tienen un estatus oxidativo alto (Inoue y cols, 2015), es posible que el sildenafil pudiese tener un efecto benéfico sobre el sistema cardiovascular que discutiremos más adelante. Con respecto a la comparación con una herramienta farmacológica (SNP) que actúa en el interior de la célula (López-López y cols, 2001) encontramos que el inhibidor de la PDE-5 es (0.21 veces menor) ligeramente menor al donador de NO confirmando la eficacia terapéutica del SNP en la hipertensión arterial pulmonar (Lim y Zaphiriou, 2016). Sin embargo, se ha descrito que los pacientes tratados con SNP presentan como reacción adversa una reducción de la presión arterial sistémica (Abdelaziz y cols, 2017) mientras que a la fecha no se ha reportado que el sildenafil presente la mencionada reacción adversa.

Con respecto a las curvas concentración-respuesta de serotonina encontramos una hipercontracción en las preparaciones provenientes de ratas tratadas con STZ que fue semejante a la encontrada por otros autores en condiciones semejantes (Santa Maria-Juarez C, 2001). Se ha propuesto que la hiperrespuesta a serotonina durante la DME esta mediada



por receptores 5HT<sub>2A</sub>, debido a que la ketanserina, un antagonista competitivo de receptores 5HT<sub>2A</sub> induce un desplazamiento hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta a serotonina (López-López y cols, 2011). El efecto de este agonista se ha atribuido a la intermediación de receptores 5HT<sub>2A</sub> pero el posible papel de otros receptores como 5-HT<sub>1B</sub> no se puede descartar (MacLean y cols, 2000). Se ha propuesto que la sobreexpresión de los receptores 5HT<sub>2A</sub> en animales diabéticos los podría ser responsable de la respuesta contráctil incrementada de 5-HT. Sin embargo, dicha posibilidad no explica la reversión de la hipercontracción por medio de inhibidores de COX-2 o EROS (López-López y cols, 2011). En este sentido se ha propuesto que durante la diabetes, el incremento del estrés oxidativo induce la sobre expresión de COX-2 y el incremento de la acción de la serotonina. El incremento de la acción de la serotonina que encontramos podría explicarse de la misma forma.

SILD/SILD	SILD/SOD	SILD/APO	SILD/NPS
1	0.98	1.19	0.71

**Tabla 4. Ponderación del efecto del sildenafil.** Cada grupo representa el cociente de la división entre el efecto máximo de las curvas a relajación con acetilcolina de los anillos arteriales pulmonares diabéticos sobre el efecto relajante máximo obtenido con acetilcolina pero en presencia de un barredor de radicales libres y un inhibidor de la NADPH oxidasa (SILD/SOD y SILD/APO, respectivamente), y sobre el efecto máximo obtenido con un donador intracelular de NO (SILD/NPS).

Encontramos que el sildenafil reduce la hipercontracción de serotonina en las arterias pulmonares de las ratas diabéticas, contribuyendo a la reducción de la disfunción endotelial que se presenta en la hiperglucemia crónica. Este hallazgo no se ha descrito en la bibliografía, por lo tanto, aportamos un resultado original al estudio de la disfunción endotelial de las arterias pulmonares de sujetos diabéticos. Con respecto al mecanismo por el cual el sildenafil evita el aumento de la acción de la serotonina, no se realizaron experimentos encaminados a dicho

objetivo durante la presente tesis. Sin embargo, la reducción del estrés oxidativo por parte del sildenafil podría ser una posible explicación, así como la posible modulación de los receptores a serotonina o respuestas inducidas por los mismos tanto en la capa endotelial o muscular.

El sildenafil es un inhibidor selectivo de PDE tipo 5 que aumenta la biodisponibilidad intracelular de GMPc. Este medicamento fue aprobado para el tratamiento de la disfunción eréctil, pero actualmente se ha observado su eficacia en los pacientes con HAP (Sastry y cols, 2004; Ghofrani y cols, 2002). El mecanismo de este efecto se ha atribuido a la capacidad para inducir una vasodilatación de la capa vascular pulmonar por medio de la inhibición selectiva de la fosfodiesterasa tipo 5 y la promoción de la acumulación intracelular de GMPc y por lo tanto, el aumento de la magnitud de la acción del NO. Aunque el mecanismo mencionado está ampliamente estudiado, se han atribuido otras acciones independientes a la inhibición competitiva de la PDE5. Por ejemplo se han atribuido al sildenafil acciones sobre el estatus oxidativo en patologías cardiovasculares (Sikandaner y cols, 2017), la disminución de la formación de placas de ateroma (Balarini y cols, 2013) y disminución de la proliferación celular (Erdogan y cols, 2007).

La acción de los inhibidores de la PDE5 sobre la reducción del estatus oxidativo se ha descrito ampliamente en arterias pulmonares (Guimaraes y cols, 2013) y renales (Dias y cols, 2014). Además se ha encontrado una reducción de los indicadores de estrés oxidativo con el consecuente incremento de los niveles del NO en ratas y pacientes con hipertensión pulmonar (You-Fei y cols, 2013; Semen, 2016). Nuestros resultados sobre la reducción de la hipercontracción a la serotonina con sildenafil podrían explicarse por el posible efecto sobre el estatus oxidativo de las arterias pulmonares de las ratas diabéticas, pues como se mencionó

anteriormente, la reducción del estrés oxidativo revierte el efecto de serotonina en ratas diabéticas (López-López y cols, 2011). Desafortunadamente, el sildenafil no logra revertir completamente la hipercontracción a dicho agonista contráctil, como sí lo hizo con la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina. Esta diferencia podría deberse a que en la relajación a Ach el sildenafil podría incrementar la biodisponibilidad del NO y la del GMPc, por sus efectos en la reducción del estatus oxidativo y por la inhibición de la PDE5.

### **8.3. Efecto “protector” del sildenafil sobre la hipertensión arterial pulmonar**

Encontramos que la DM favorece el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar como se ha descrito anteriormente (López-López y cols, 2008; Moral-Sanz y cols, 2012) y que en las ratas diabéticas que son tratadas con sildenafil, se reduce de manera significativa el grado de hipertensión pulmonar. El efecto protector de los inhibidores de la PDE5 en modelos animales y en pacientes con hipertensión pulmonar ya ha sido descrito (Dai y cols, 2006; Galié y cols, 2016). Sin embargo, a la fecha no se ha publicado este efecto protector mediado por el sildenafil en hipertensión pulmonar inducida por DM. El mecanismo de la hipertensión pulmonar en sujetos diabéticos se ha descrito anteriormente y se propone que la DM induce un incremento del estrés oxidativo provocado por la sobre regulación de la NADPH oxidasa pulmonar (López-López y cols, 2008) y de la COX-2 (López-López y cols, 2011). El mecanismo por el cual el sildenafil reduce el grado de hipertensión pulmonar que encontramos en las ratas con DM, puede ser atribuido a la completa relajación dependiente del endotelio y la reducción de la hipercontracción que presentaron las arterias pulmonares de ratas diabéticas, con la correspondiente reducción de la resistencia del lecho vascular pulmonar.

En cuanto a la presión de pulso; estima la elasticidad de las arterias, por lo que se le considera como un predictor de sucesos cardiovasculares adversos, donde un valor elevado de este parámetro está relacionado con mayor probabilidad de padecer algún evento. Nosotros encontramos que la diabetes genera aumento de la presión de pulso pulmonar en las ratas diabéticas indicando que esta enfermedad no solamente modifica la distensibilidad arterial sistémica (Domanski y cols, 2002), sino también la pulmonar, haciendo evidente un estado de daño vascular generalizado por esta enfermedad. Afortunadamente el tratamiento con sildenafil logró evitar el desarrollo de la rigidez vascular, el cual creemos que se debe a que evita la remodelación vascular (engrosamiento de las paredes) y por lo tanto se mantienen las capacidades elásticas de los vasos sanguíneos, permitiendo el correcto funcionamiento vascular y disminuyendo la probabilidad de generar un suceso cardiovascular adverso.

#### **8.4. Efecto del sildenafil sobre la hipertrofia del ventrículo derecho**

Encontramos que las ratas diabéticas con hipertensión pulmonar presentaron hipertrofia del ventrículo derecho como se ha descrito anteriormente (Di Petta y cols, 2015). Este hecho es atribuido a la respuesta compensatoria que desarrolla el VD por el aumento de presión arterial pulmonar y que desencadena una serie de mecanismos que compensan el aumento de la resistencia vascular por parte de la arteria pulmonar con aumento en la fuerza contráctil cardíaca derecha, lo que conlleva al aumento de la masa muscular derecha (hipertrofia ventricular derecha).

Nosotros encontramos que durante la hipertensión arterial pulmonar diabética se encuentra aumentada significativamente la expresión de la PDE5 en corazón. Este mismo efecto ya se había descrito durante la diabetes, pero en otro tipo de tejidos como los cuerpos cavernosos

del pene (Ellati y cols, 2012), y durante la insulino resistencia en las células del musculo liso vascular (Russo y cols, 2008), entre otras patologías cardiovasculares como la hipertensión arterial pulmonar no diabética (en arterias pulmonares) (Farrow y cols, 2010).

Los papeles fisiológicos de la expresión y función de la PDE5 a nivel cardiaco actualmente se encuentran poco esclarecidos, por lo que en esta tesis aportamos una evidencia más de los efectos y mecanismos que podrían estar involucrados en la regulación cardíaca, a través de la inhibición de esta enzima, tanto en condiciones control como durante la DM.

En el corazón, el GMPc ejerce sus funciones a través de efectores posteriores, que incluyen proteína quinasa G (PKG), proteínas de unión a GMPc y canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (Shan y cols, 2012). Estudios en humanos informaron una mayor abundancia de PDE5 en el ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardíaca respecto a pacientes sanos (Pokreisz y cols, 2009; Lu y cols, 2010). En el 2012 se reveló que existen cambios significativos en la expresión de la PDE5 durante la falla cardíaca, específicamente durante la miocardiopatía idiopática dilatada y la miocardiopatía isquémica terminal. Sin embargo, la comparación en diferentes subgrupos de insuficiencia ventricular derecha sugiere heterogeneidad en el grado de elevación de PDE5 en el VD defectuoso según el grado de insuficiencia (Shan y cols, 2012). Otro estudio encontró un aumento de la PDE5 del ventrículo derecho en los recién nacidos y niños pequeños con anomalías cardíacas congénitas (Nagendran y cols, 2007). En cada caso, el impacto sobre la función cardíaca se ha reportado con una mayor expresión de PDE5 tiende a deprimir las funciones contráctiles del miocardio (Shan y cols, 2012). Bajo este sentido nosotros aportamos que también durante

la HAP inducida por diabetes se genera un aumento en la expresión de la PDE5 en corazón y que este hecho puede estar modificando la función cardíaca en nuestro modelo animal.

Por otra parte, cuando administramos sildenafil a nuestros animales diabéticos observamos que se evita la sobreexpresión de la PDE5 en corazón y se evita el desarrollo de HVD, lo que concuerda con otros estudios como en el caso de hipertensión sistémica en los cuales describieron que la administración crónica de sildenafil previene y revierte la hipertrofia cardíaca izquierda inducida por la constricción aórtica transversal (Takimoto y cols, 2005), además el tratamiento con sildenafil suprimió el aumento de presión ventricular inducida por el aumento de la poscarga, y de esta manera evitó la hipertrofia de miocitos y mejoró la función cardíaca, aunque no reportaron la disminución de la expresión de PDE5. Por otra parte, un caso donde sí se reportó que el sildenafil evita la sobreexpresión de la PDE5 en corazón, fue durante la insuficiencia cardíaca congestiva donde a dosis diarias de 50 mg/kg de sildenafil por 2 semanas se observó una disminución significativa de la sobreexpresión de la PDE5 (Lu y cols, 2010).

Otro ejemplo del efecto benéfico del sildenafil a nivel cardíaco es que el tratamiento crónico con sildenafil atenúa la remodelación del ventrículo izquierdo y la intolerancia al ejercicio después de la regurgitación mitral crónica (Kim y cols, 2012), por lo que, se sugiere que el beneficio del sildenafil está asociado con efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios (Das y cols, 2015). Además, el sildenafil revirtió la hipertrofia preestablecida inducida por la sobrecarga de presión al tiempo que restauraba la función ventricular hasta la normalidad. La PDE5 aumentó en corazones cargados de presión que se asoció con un aumento del catabolismo del GMPc. Por lo que, la inhibición de PDE5 condujo a la restauración de la

señalización de GMPc y la activación de PKG que es una proteína cinasa específica de serina/treonina que se activa mediante GMPc y que fosforila una serie de objetivos biológicamente importantes y está implicado en la regulación del músculo liso, división celular (inhibición) y síntesis de ácidos nucleicos. Los efectos anti-hipertróficos coincidieron con la activación de la PKG, y sus objetivos incluían el regulador de la señalización 2 acoplada a proteínas G, así como la calcineurina-NFAT y el potencial transitorio del canal V1 (TRPV1), uno de los canales iónicos no selectivos y no dependientes del voltaje que transmiten información de señalización vinculada a una amplia gama de entradas sensoriales (Zhang y Kass, 2011). De esta manera también se explica la inhibición por parte del sildenafil de otro mecanismo implicado en la HVD como es la hiperplasia.

Por lo tanto, ya se ha demostrado que la inhibición de la PDE5 es benéfica para los pacientes con hipertensión arterial pulmonar no diabética que son propensos a la insuficiencia del ventrículo derecho, para los pacientes con insuficiencia cardíaca (Ramani y Park, 2010; Guazzi y cols, 2011) y en esta ocasión demostramos que también son benéficos en el tratamiento de la HAP diabética. Además, los inhibidores de PDE5 al ser vasodilatadores pulmonares pueden aumentar la función del ventrículo derecho mediante una disminución de la poscarga ventricular.

El miocardio adulto está compuesto por varios tipos de células, incluidos miocitos cardíacos, fibroblastos, células endoteliales y células de músculo liso vascular. Sin embargo se ha demostrado que el aumento cardíaco de la PDE5 se genera principalmente por aumento de esta ciclasa de GMPc en los miocitos (Shan y cols, 2012), por lo que, nosotros esperaríamos

que también sea en este tipo celular donde el sildenafil esté inhibiendo la expresión de la PDE5 (principalmente).

#### **8.4.1. Efectos antiinflamatorios del sildenafil en corazones diabéticos**

Por otra parte, y como es bien sabido, la hiperglucemia en pacientes diabéticos se asocia con una prevalencia de la inflamación sistémica (Aronson y cols, 2004; Varo y cols, 2003). Esto se debe a que la hiperglucemia aumenta la unión de las células inflamatorias al endotelio (Morigi y cols, 1998) y también potencia la producción de citocinas inflamatorias en los monocitos (Das y cols, 2015). Curiosamente, el tratamiento con PDE5i mostró una reducción significativa de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y un aumento significativo de la citocina antiinflamatoria IL-10 durante la diabetes (Varma et al., 2012). En conjunto, estos hallazgos junto con datos recientes obtenidos de humanos muestran mejoría en la miocardiopatía diabética después del tratamiento crónico con sildenafil (Giannetta y cols, 2012), por lo que nosotros lo correlacionamos este efecto de la misma manera como un mecanismo implicado en la protección contra la HVD durante la HAP diabética.

#### **8.4.2. La inhibición de PDE5 promueve efectos similares a los antioxidantes en el corazón diabético**

En condiciones diabéticas, el miocardio está expuesto a un intenso estrés oxidativo, que finalmente conduce a una lesión y disfunción del tejido cardíaco. Se ha reportado que el tratamiento crónico con inhibidores de la PDE5 causa una supresión significativa en la producción de EROS, de la actividad de la NADPH oxidasa cardíaca, de la peroxidación lipídica y el glutatión oxidado (Koka y cols, 2013). Además, el tratamiento con PDE5i atenúa la expresión miocárdica de pRac1 y gp91phox, y su análisis proteómico reveló que la glutatión



S-transferasa (GST) y kappa 1 (GSTK1) (una enzima antioxidante mitocondrial) se deprimió significativamente en los corazones diabéticos (Koka y cols, 2012). Sin embargo, interesantemente, el tratamiento con PDE5i conserva completamente GSTK1, lo que se asoció con una relación GSH/GSSG cardíaca mejorada (Koka y cols, 2012), lo que indica un estrés oxidativo atenuado en el corazón diabético (Das y cols, 2015). De esta manera podemos esperar que el sildenafil reduzca el estatus oxidativo en nuestro modelo experimental, traduciéndose en un efecto benéfico a nivel ventricular derecho durante la HAP diabética, constituyendo un modelo que suma a la explicación del efecto anti-hipertrófico ventricular derecho.

Con todo este conjunto de evidencias discutidas, podemos sugerir que en nuestro modelo animal de DME el tratamiento con sildenafil evita la hipertrofia ventricular derecha debido no solamente a que inhibe selectivamente a la PDE5, sino también a que evita su sobreexpresión cardíaca; así como también a que actúa a diversos niveles tanto bioquímicos como genéticos manteniendo la correcta función cardíaca.

Por otra parte, al administrar el sildenafil en condiciones control hallamos que hay un aumento significativo en la expresión de la PDE5, lo que puede deberse a que el promotor del gen *pde5A* es inducible por GMPc (Lin y cols, 2002), que se traducirá en un aumento de la PDE5 como efecto fisiológico compensatorio al aumento de la concentración de GMPc intracelular provocado por la inhibición de su ciclase.

## 9. Perspectivas

Debemos profundizar en los mecanismos involucrados en la regulación del tono vascular y de la remodelación cardíaca por parte del sildenafil durante la DM. Nosotros esperamos que no solamente actúe como inhibidor de la PDE5, sino que también disminuya el estrés oxidativo y aumente las enzimas antioxidantes (como se ha reportado en otros modelos). Además, que también disminuya la expresión de la PDE5 en las arterias pulmonares para poder sumar al mecanismo que explique la recuperación de la función endotelial y la disminución de la HAP. Por otra parte, también podríamos evaluar como la presencia del sildenafil durante la DM modifica las concentraciones intracelulares de GMPc (confirmando su mecanismo de acción) y como interviene en su vía de señalización para favorecer vasodilatación y evitar el desarrollo de HAP y el remodelamiento cardíaco. También evaluar si durante la DM el sildenafil disminuye los marcadores de daño cardíaco para averiguar si el efecto observado en nuestro modelo es debido a la cardiopatía diabética o a la disminución de la HAP.

## **10. Conclusiones**

El mantenimiento de la función endotelial por parte del sildenafil en las arterias pulmonares contribuye a la reducción de la hipertensión pulmonar de las ratas con DM experimental.

La disminución de la sobreexpresión de la PDE5 en el corazón por parte del sildenafil y la reducción en la poscarga ventricular evitaron la hipertrofia del ventrículo derecho de las ratas con DM experimental.

## 11. Bibliografía

- Abdelaziz HK, Elkilany W, Khalid S, Sabet S, Saad M.** Efficacy and safety of intracoronary verapamil versus sodium nitroprusside for the prevention of microvascular obstruction during primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 28; 11-16. 2017
- Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B.** Appetite-suppressant drugs and the risk of pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 335; 609–616. 1996
- Abernethy AD, Stackhouse K, Hart S, Devendra G, Bashore TM, Dweik R, Krasuski RA.** Impact of diabetes in patients with pulmonary hypertension, *Pulmonary Circulation.* 5; 117–123. 2015
- Akagi K, Nagao T, Urushidani T.** Correlation between Ca<sup>2+</sup> oscillation and cell proliferation via CCKB/gastrin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1452; 243-253. 1999
- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Verdi AA, Mofidian SM, Rad BL.** Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem.* 22; 60-4. 2007
- 5º Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar,** Niza, Francia, Febrero de 2013
- Agoston LC and Lupu S.** Right Chambers Quantification in Clinical Practice: Echocardiography Compared with Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Intech.* 2; 11-50. 2013
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition New York: Garland Science; 2002
- Alves JL, Oleas FG, Souza R.** Pulmonary Hypertension: Definition, Classification, and Diagnosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 38; 561-570. 2017
- Al-Shafei, Al, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD, Huang CL.** Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *Am J Physiol.* 538; 541-553. 2002
- Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M and Bencova A.** Physiology of Nitric Oxide in the Respiratory System. *Physiol. Res.* 66; S159-S172, 2017
- Archer SL, Fang Y-H, Ryan JJ, Piao L.** Metabolism and bioenergetics in the right ventricle and pulmonary vasculature in pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 3; 144–52. 2013
- Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D and Weir EK.** A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ Res.* 73; 1100-1012. 1993
- Arends SJ, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, Boomars K, Broers B, Tervaert JW, van Paassen P.** Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 35; 923–5. 2010

**Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Shitman E, Markiewicz W, Brook GJ, Levy Y.** Association between fasting glucose and C-reactive protein in middle-aged subjects. *Diabet Med.* 21; 39–44. 2004

**Atef ME, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced expression of Gqalpha and PLC-beta1 proteins contributes to vascular smooth muscle cell hypertrophy in SHR: role of endogenous angiotensin II and endothelin-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307; C97-106. 2014

**Atef, ME and Anand-Srivastava MB.** Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gqalpha/PLCbeta1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: role of growth factor receptor transactivation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310; H608-618. 2016

**Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, Palomero T, Sumazin P, Kim HR, Talati MH, West J, Loyd JE, Chung WK.** Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet* 5; 336–343. 2012

**Aversa A, Greco E, Bruzziches R, Pili M, Rosano G, Spera G.** Relationship between chronic tadalafil administration and improvement of endothelial function in men with erectile dysfunction: a pilot study. *Int J Impot Res.* 19; 200–207. 2007

**Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC.** Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med.* 5; 11:3. 2013

**Barnes PJ and Liu SF.** Regulation of pulmonary vascular tone. *ASPET.* 47; 87-131. 1995

**Basheer R, Jalal MJ, Gomez R.** An unusual case of adolescent type 2 diabetes mellitus: Prader-Willi syndrome. *J Family Med Prim Care.* 5; 181-3. 2016

**Baumeier C, Schlüter L, Saussenthaler S, Laeger T, Rödiger M, Alaze SA, Fritsche L, Häring HU, Stefan N, Fritsche A, Schwenk RW, Schürmann A.** Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 6; 1254-1263. 2017

**Beery AK and Zucker I.** Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 35; 565–572. 2011

**Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Wainstein MV, Boff W, Puñales M.** Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes.* 10; 679-92. 2015

**Bertrand PP and Bertrand RL.** Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 153; 47–57. 2010

**Bobin P, Belacel-Ouari M, Bedioune I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, Fischmeister R, Vandecasteele G.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of Cardiovascular Disease.* 109, 431—443. 2016

**Bogaard HJ1, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM, Voelkel NF.** Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation.* 120; 1951–60. 2009

**Briones AM and Touyz RM.** Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr. Hypertens. Rep.* 12; 135-142. 2010

**Brownlee M and Giacco F.** Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res.* 107; 1058 – 1070. 2010

**Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813– 820, 2001

**Calcuttea A, Chung R, Lindqvist P, Hodson M, Henein MY.** Differential right ventricular regional function and the effect of pulmonary hypertension: three-dimensional echo study. *Heart.* 97; 1004–11. 2011

**Callaghan MJ, Ceradini DJ and Gurtner GC.** Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function, *Antioxidants and Redox Signaling.* 7; 1476–1482 2005

**Carrol M, Hebert V, Chotibut T, Wensler H, y cols.** 4',4'-Methylenedianiline alters serotonergic transport in a novel, sex-specific model of pulmonary arterial hypertension in rats. *Toxicological Sciences.* 147; 235-245. 2015

**Cavalcanti CO, Alves RR, de Oliveira AL, Cruz JC, de França-Silva MS, Braga VA, Balarini CM.** Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 28; 7-15, 2016

**Cé GV, Rohde LE, da Silva AM, Puñales MK, de Castro AC, Bertoluci MC.** Endothelial dysfunction is related to poor glycemic control in adolescents with type 1 diabetes under 5 years of disease: evidence of metabolic memory. *J Clin Endocrinol Metab.* 96; 1493–1499. 2011

**Ceriello A, Novials A, Ortega E, La Sala L, Pujadas G, Testa R, Bonfigli AR, Esposito K and Giugliano D.** Evidence that hyperglucemia after recovery from hipoglucemia worsen endotelial fuction and increase oxidative stress and inflamation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. *Diabetes* 61:2993–2997, 2012

**Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo Kim S, Ha J.** The regulation of AMP-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 287:92–97, 2001

**Christou H, Reslan OM, Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Touma M, Arons E, Mitsialis SA, Kourembanas S, and Khalil RA.** Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302; L875–L890. 2012

**Chugani DC.**  $\alpha$ -methyl-I-tryptophan: mechanisms for tracer localization of epileptogenic brain regions. *Biomark Med.* 5; 567–575. 2011

**Cidad P, Jiménez-Pérez L, García-Arribas D, Miguel-Velado E, Tajada S, Ruiz-McDavitt C, López-López JR, Pérez-García MT.** Kv1.3 Channels Can Modulate Cell Proliferation During Phenotypic Switch by an Ion-Flux Independent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32; 1299-1307. 2012

**Clapp LH and Gurung R.** The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension: Role of membrane versus nuclear receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 120; 56-71. 2015

**Cogolludo A, Frazziano G, Cobeno L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, Tamargo J, Perez-Vizcaino F.** Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries. *Ann N Y Acad. Sci.* 1091; 41-51. 2006

**Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F.** Thromboxane A<sub>2</sub>-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C $\zeta$ . *Circ Res.* 93; 656-63. 2003

**Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castañeda J, González C, Villamor E, Perez-Vizcaino F.** Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 82; 296-302. 2009

**Comellas AP and Briva A.** Role of endothelin-1 in Acute Lung Injury. *Transl Res.* 153; 263-27. 2009

**Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Schaff HV.** Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med.* 337; 581–588. 1997

**Coppock EA, Martens JR, Tamkun MM.** Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281; L1-12. 2001

**Corbin JD, Francis SH, Webb DJ.** Phosphodiesterase Type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology.* 60, 4–11. 2002

**Coustan DR.** Gestational diabetes mellitus. *Clin Chem.* 59; 1310-21 2013

**Dai ZK, Chin MT, Yin CC, Hwa C, Chin PL, Lai JY, Chung C, Jun IC, and Ren JW.** Effects of sildenafil on pulmonary hypertension and level of ET-1, eNOS, and cGMP in aorta-banded rats. *Exp Biol Med.* 231; 942-947. 2006

**Dandan Yin, Qianchen Wang, Xun Zhou and Ying Li.** Endothelial dysfunction in renal arcuate arteries of obese Zucker rats: The roles of nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factors, and calcium-activated K<sup>+</sup> channels. *PLoS One.* 12; e0183124. 2017

**Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L and Kukreja RC.** PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther.* 147: 12-21. 2015

**De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T.** International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52; 415-72. 2000

**Desouza C, Parulkar A, Lumpkin D, Akers D, Fonseca VA.** Acute and prolonged effects of sildenafil on brachial artery flow-mediated dilatation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25; 1336–1339. 2002

**Dikalov S.** Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 51; 1289-301. 2011

**Di Paolo S., Gesualdo L, Ranieri E., Grandaliano G, Schena F.** High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor-beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cells. *The American Journal of Pathology*. 149; 2095–2106, 1996

**Di Petta A, Simas R, Ferreira CL, Capelozzi VL, Salemi VM, Moreira LF, Sannomiya P.** Effects of the association of diabetes and pulmonary emphysema on cardiac structure and function in rats. *Int J Exp Pathol*. 96; 350-7. 2015

**Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Dartevelle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S.** Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension – critical role for serotonin-induced smooth muscle hiperplasia. *Circulation*. 113; 1854-64. 2006

**Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmin M, Capron F, Simonneau G, Dartevelle P, Hamon M, Adnot S.** Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle cell hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 108; 1141–1150. 2001

**Ellati RT, Dokun AO, Kavoussi PK, Steers WD, Annex BH, Lysiak JJ.** Increased Phosphodiesterase Type 5 Levels in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Sex Med*. 10; 362-9. 2013

**ENSANUT.** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. 2016

**Erdogana A, Schaefer MB, Wolfram-Kuhlmann CR, Marc M, Konstantin H, Fabrice M, Rennerb C, Schaeferc C, Abdallahc Y, Hoelschermann H, Schaefer CA.** Activation of Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels is involved in lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Athero*. 190; 100-105. 2007

**Evans CE, Humphries J, Waltham M, Saha P, Mattock K, Patel A, Ahmad A, Wadoodi A, Modarai B, Burnand K, Smith A.** Upregulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha in local vein wall is associated with enhanced venous thrombus resolution. *Thromb Res*. 128; 346-51. 2011

**Fabre A, Marchal-Sommé J, Marchand-Adam S, Quesnel C, Borie R, Dehoux M, Ruffié C, Callebert J, Launay JM, Hénin D, Soler P, Crestani B.** Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur Respir J*. 32; 426–436. 2008

**Fahning BM, Dias AT, Oliveira JP, Gava AL, Porto ML, Gomes IB, Nogueira BV, Campagnaro BP, Pereira TM, Vasquez EC, Balarini CM, Meyrelles SS.** Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension. *Curr Pharm Biotechnol*. 16; 823-31, 2015

**Fanburg BL and Lee SL.** A new role for an old molecule: 5-HT as a mitogen. *Am J Physiol*. 16; L795-L806. 1997

**Faraci FM and Didion SP.** Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24; 1367-73. 2004

**Farber HW and Loscalzo J.** Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 351; 1655-65. 2004



**Farrow KN, Lakshminrusimha S, Czech L, Groh BS, Gugino SF, Davis JM, Russell JA, Steinhorn RH.** SOD and inhaled nitric oxide normalize phosphodiesterase 5 expression and activity in neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Jul; 299; L109–L116. 2010

**Feng C.** Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions *Coord Chem Rev.* 256; 393–411. 2012

**Ferreira I, Hovind P, Schalkwijk CG, Parving HH, Stehouwer CDA, Rossing P.** Biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction as predictors of pulse pressure and incident hypertension in type 1 diabetes: a 20 year life-course study in an inception cohort. *Diabetologia.* 3; 1- 11. 2017

**Fessel J, Flynn CR, Robinson LJ, Penner NL, Gladson S, Kang CJ, Wasserman DH, Hemnes AR, West JD.** Hyperoxia synergizes with mutant bone morphogenic protein receptor 2 to cause metabolic stress, oxidant injury, and pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49;778-787, 2013

**Federación Internacional de la Diabetes (FID).** Atlas de la Diabetes de la FID. 7; 1-142. 2015

**Firth AL, Won JY, Park WS.** Regulation of  $Ca^{2+}$  signaling in pulmonary hypertension. *Korean J Physiol Pharmacol.* 17; 1-8. 2013

**Fouty B.** Diabetes and the pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295; L725-6. 2008

**Francis BN, Salameh M, Khamisy-Farah R, Farah R.** Tetrahydrobiopterin (BH4): Targeting endothelial Nitric Oxide Synthase as a potential therapy for Pulmonary Hypertension. *Cardiovasc Ther.* (Accepted article). 2017

**Frasch HF, Marshall C, Marshall BE.** Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 276; L304-10. 1999

**Frazziano G, Moreno L, Moral-Sanz J, Menendez C, Escolano L, Gonzalez C, Villamor E, Alvarez-Sala JL, Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F.** Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cell Physiol.* 226; 2633-40. 2011

**Fritz JS, Blair C, Oudiz RJ, Dufton C, Olschewski H, Despain D, Gillies H, Kawut SM.** Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 143; 315–23. 2013

**Gabbay E, Fraser J, McNeil K.** Review of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 3; 887–900. 2007

**Gain SP and Rubin LJ.** Primary pulmonary hypertension. *The Lancet.* 352; 719-725. 1998

**Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G.** Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med.* 353; 2148—57. 2005

**Galiè N, Humbert M, Vachier JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M.** 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 69: 177. 2016

**Galié N, Palazzini M, Manes A.** Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. *European heart journal*. 31; 2080-2086. 2010

**Gamoh S., Hisa H, Yamamoto R.** 5-hydroxytryptamine receptors as target for drug therapies of vascular-related diseases. *Biol. Pharm. Bull.* 36; 1410-1415. 2013

**Gazzaruso C, Solerte SB, Pujia A, Coppola A, Vezzoli M, Salvucci F, Valenti C, Giustina A, Garzaniti A.** Erectile Dysfunction as a Predictor of Cardiovascular Events and Death in Diabetic Patients With Angiographically Proven Asymptomatic Coronary Artery Disease: A Potential Protective Role for Statins and 5-Phosphodiesterase Inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51; 2040-2044. 2008

**Ghofrani HA, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F.** Sildenafil for treatment of severe pulmonary hypertension and commencing right-heart failure]. *Pneumologie*. 56; 665-72. 2002

**Giacco F and Brownlee M.** Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 107:1058–1070. 2010

**Giaid A and Saleh D.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 333:214—21. 1995

**Giannetta E, Isidori AM, Galea N, Carbone I, Mandosi E, Vizza CD, Naro F, Morano S, Fedele F, Lenzi A.** Chronic Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation*. 125; 2323–2333. 2012

**Gogitidze JN, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, Davis SN.** Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care*. 33:1529–1535. 2010

**Goppelt S and Stroebel M.** Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin G/H synthase-2 and erg-1 by serotonin via 5HT2A receptors. *J Cell Physiol*. 175; 341-347. 1998

**Goupil S, Maréchal L, Hajj HE, Tremblay ME, Richard FJ and Leclerc P.** Identification and Localization of the Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Bovine Testis and Mature Spermatozoa. *PLoS One*. 11: e0161035. 2016

**Grant JS, White K, MacLean MR, Baker AH.** microRNAs in pulmonary arterial remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 70;4479–94. 2013

**Griendling K, Lassègue B, Alexander R.** Angiotensin receptors and their therapeutic applications. *Annu Rev Pharmacol.* 36; 281-306. 1996

**Grinnan FG, Fox A, Sweeney L.** The Role of Hyperglycemia and Insulin Resistance in the Development and Progression of Pulmonary Arterial Hypertension. 1-7. *J Diab Resch.* 2016

**Grover-Paez F, Villegas RG, Guillen OR.** Sildenafil citrate diminishes microalbuminuria and the percentage of A1c in male patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 78; 136–140. 2007

**Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD.** PDE5 Inhibition With Sildenafil Improves Left Ventricular Diastolic Function, Cardiac Geometry, and Clinical Status in Patients With Stable Systolic Heart Failure: Results of a 1-Year, Prospective, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Circ Heart Fail.* 4; 8–17. 2011

**Gusan S and Anand-Srivastava M.** cAMP attenuates the enhanced expression of Gi proteins and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells from SHR: role of ROS and ROS-mediated signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304; C1198-1209. 2013

**Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57; 473-508. 2005

**Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM.** Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ.* 105; 1656–1662. 2002

**Hadcock S, Richardson M, Winocour PD, Hatton MW.** Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler Thromb.* 11; 517–529. 1991

**Hartney T, Birari R, Venkataraman S, Villegas L, Martinez M, Black SM, Stenmark KR, Nozik-Grayck E.** Xanthine oxidase-derived ROS upregulate Egr-1 via ERK1/2 in PA smooth muscle cells; model to test impact of extracellular ROS in chronic hypoxia. *PLoS One.* 6; e27531. 2011

**Hardie DG and Carling D.** The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246:259 –273, 1997

**Hasslacher C and Bermejo LJ.** Treatment with insulin analogs and prevalence of cardiovascular complications in patients with type 1 diabetes. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 8; 149-157. 2017

**Hayabuchi Y, Standen NB, Davies NW.** Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K(+) channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281; H2480-9. 2001

**Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M.** Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 54; S10–9. 2009

**Hemmati AA, Forushani HM and Asgari HM.** Wound Healing Potential of Topical Amlodipine in Full Thickness Wound of Rabbit. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 9; e15638. 2014

**Hernandez S, van-Marter LJ, Werler MM, Louik C, Mitchell AA.** Risk Factors for Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Pediatrics*. 120; e272-e282. 2006

**Herrera B, Alvarez AM, Sánchez A.** Active oxygen species mediate the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor in fetal hepatocytes. *FASEB J*. 115; 741-9. 2001

**Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L, Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L.** Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am. J. Med.* 99; 249–254. 1995

**Hilal-Dandan R and Brutom LL.** Manual de farmacología y terapéutica, Goodman & Gilman. 2e. McGraw-Hill Education. 2012

**Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T.** Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 88; E14-22. 2001

**Hironaka E, Hongo M, Sakai A, Mawatari E, Terasawa F, Okumura N, Yamazaki A, Ushiyama Y, Yazaki Y, Kinoshita O.** Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc. Res*. 60; 692–699 2003

**Hobbs AJ and Ignarro LJ.** Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol*. 269; 134-48. 1996

**Hossain E and Anand-Srivastava MB.** Resveratrol prevents angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells through the transactivation of growth factor receptors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 95; 945-953. 2017

**Hua H, Goldberg H, Fantus I, Whiteside C.** High glucose enhanced mesangial cell extracellular signal regulated protein kinase activation and 1 (IV) collagen expression in response to endothelin-1: role of specific protein kinase C isozymes. *Diabetes*. 50; 2376–2383, 2001

**Hundahl LA, Tfelt-Hansen J, Jespersen T.** Rat Models of Ventricular Fibrillation Following Acute Myocardial Infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 22; 2017

**Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hyper-tension. *J Am Coll Cardiol*. 43; 13S–24S. 2004

**Humbert M, Sitbon O, Simonneau G.** Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 351; 1425–36. 2004

**Hwang J, Saha A, Boo YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, Dikalov S, Giddens DP, Griendling KK, Harrison DG, Jo H.** Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O<sub>2</sub> from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem*. 278; 47291-8. 2003

**Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL.** Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89; 11059–11063. 1992

**Inoue T, Inoguchi T, Sonoda N, Hendarto H, Makimura H, Sasaki S, Yokomizo H, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R.** GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Atherosclerosis.* 240; 250-9. 2015

**Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).** Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar primaria en el adulto. México: Secretaría de salud, 2010

**Irvine JC, Favaloro JL, Kemp-Harper BK.** NO- Activates Soluble Guanylate Cyclase and Kv Channels to Vasodilate Resistance Arteries. *Hypertension.* 41; 1301-1307. 2003

**Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, Kangawa K, Kimura H.** A Combination of Oral Sildenafil and Beraprost Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 34-38. 2004

**Jackson WF.** Chapter Three - Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv. Pharmacol.* 78; 89-144. 2017

**Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK.** Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood.* 119; 3394–3402. 2012

**Jernigan NL, Walker BR, Resta TC.** Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295; L515-L529. 2008

**Jung CH, Lee MJ, Kang YM, Lee YL, Seol SM, Yoon HK, Kang SW, Lee WJ, Park JY.** C1q/TNF-related protein-9 inhibits cytokine-induced vascular inflammation and leukocyte adhesiveness via AMP-activated protein kinase activation in endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 419; 235-43. 2016

**Karpuz D, Hallioglu O, Buyukakilli B, Gurgul S, Balli E, Ozeren M, Tasdelen B, Listy BL.** Clinical and histopathological relationship of sildenafil and bosentan treatments in rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension. 118; 544-551. 2017

**Kayık G, Tüzün N, Durdagi S.** Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32:1, 311-330. 2017

**Kedzierski RM and Yanagisawa M.** Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol.* 41; 851-876. 2001

**Kelvin P and Davies KP.** Development and therapeutic applications of nitric oxide releasing materials to treat erectile dysfunction *Future Sci OA.* 1; FSO53. 2015

**Kerner W and Brückel J.** Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 122; 384-6. 2014

**Kim KH, Kim YJ, Ohn JH, Yang J, Lee SE, Lee SW, Kim HK, Seo JW, Sohn DW.** Long-term effects of sildenafil in a rat model of chronic mitral regurgitation: benefits of ventricular remodeling and exercise capacity. *Circulation.* 125; 1390–1401. 2012

**Kind T, Mauritz G-J, Marcus JT, van de Veerdonk M, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A.** Right ventricular ejection fraction is better reflected by transverse rather than longitudinal wall motion in pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Magn Reson.* 12:35. 2010

**Kishi K, Yuasa T, Minami A, Yamada M, Hagi A, Hayashi H, Kemp BE, Witters LA, Ebina Y.** AMP-activated protein kinase is activated by the stimulations of G(q)-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 276; 16 –22, 2000

**Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S.** Roles of thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 114; 784–794. 2004

**Kojda G and Harrison D.** Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 43; 562–571. 1999

**Koka S, Das A, Salloum FN, Kukreja RC.** Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 60; 80–88. 2013

**Koka S, Das A, Zhu SG, Durrant D, Xi L, Kukreja RC.** Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy without interfering with chemotherapeutic effect. *J Pharmacol Exp Ther.* 334; 1023–1030. 2010

**Koka S, Xi L, Kukreja RC.** Chronic treatment with long acting phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil alters proteomic changes associated with cytoskeletal rearrangement and redox regulation in Type 2 diabetic hearts. *Basic Res Cardiol.* 107; 249. 2012

**Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Veronica-Amarie O, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Theo-Schermuly R, Eickelberg O.** Increased expression of 5-hydroxytryptamine<sub>2A/B</sub> receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax.* 65, 949–955. 2010.

**Kotera J, Fujishige K, Imai Y, Kawai E, Michibata H, Akatsuka H, Yanaka N and Omori K.** Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases *Eur. J. Biochem.* 262, 866-872.1999

**Kotera J, Yanaka N, Fujishige K, Imai Y, Akatsuka H, Ishizuka T, Kawashima K and Omori K.** Expression of rat GMP binding cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. *Eur. J. Biochem.* 249, 34-442. 1997

**Kuang T, Wang J, Pang B, Huang X, Burg ED, Yuan JXJ, Wang C.** Combination of Sildenafil and Simvastatin Ameliorates Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 23; 456–464. 2010

**Kuno Y, Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Akizawa T.** Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, attenuates diabetic nephropathy in non-insulin-dependent Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Br J Pharmacol.* 162; 1389-400. 2011

**Kurtel H and Ghandour S.** Endothelins and inflammation: the gastrointestinal system. *Pathophysiology.* 6; 77-89. 1999

**La M and Reid JJ.** Endothelin -1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol P.* 22; 315-323. 1995

**Lang IM and Gaine SP.** Recent advances in targeting the prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2015; 24: 630-641. *Eur Respir Rev.* 26; 155067. 2017

**Laude K, Cai H, Fink B, Hoch N, Weber DS, McCann L, Kojda G, Fukai T, Schmidt HH, Dikalov S, Ramasamy S, Gamez G, Griendling KK, Harrison DG.** Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288; H7-12. 2005

**Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC.** Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. *Curr Pharm biotechnol.* 16; 517. 2015

**Lee CMY, Versace VL, Malo JA, Shaw JE, Dunbar JA, Colagiuri S.** Screening for diabetes prevention with diabetes risk scores - A balancing act. *Diabetes Res Clin Pract.* S0168 - 8227; 31486-9. 2017

**Lee RC and Ping JA.** Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. *J Surg Res.* 49; 463–6. 1990

**Leuchte HH, El Nounou M, Tuerpe JC, Hartmann B, Baumgartner RA, Vogeser M, Muehling O, Behr J.** N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest.* 131; 402–9. 2007

**Lim HS and Zaphiriou A.** Sodium Nitroprusside in Patients With Mixed Pulmonary Hypertension and Left Heart Disease: Hemodynamic Predictors of Response and Prognostic Implications. *J Card Fail.* 22; 117-24. 2016

**Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue F.** Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *International Journal of Impotence Research.* 14; 15–24. 2002

**Lin SJ, Hong CY, Chang MS, Chiang BN, Chien S.** Increased aortic endothelial death and enhanced transendothelial macromolecular transport in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 36; 926–930. 1993

**Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL.** Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res* 95, 579-586. 2004

**López-Candales A.** Determinants of an abnormal septal curvature in chronic pulmonary hypertension. *Echocardiography*. 32; 49–55. 2015

**López-López JG, Moral J, Frazziano G, Gómez MJ, Flores J, Monjaraz E, Cogolludo A, Pérez-Vizcaino F.** Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295, L727-L732. 2008

**López-López JG, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Ibarra M, Zaragoza-Arnaez F, Tamargo J.** Nitric oxide- and nitric oxide donors- induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol*. 133; 615-624. 2001

**López-López, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Moreno L, Menendez C, Flores-Hernandez J, Lorente JA, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F.** Type 1 Diabetes-Induced Hyper-Responsiveness to 5-Hydroxytryptamine in Rat Pulmonary Arteries via Oxidative Stress and Induction of Cyclooxygenase-2. *JPET*. 359; 123-145. 2011

**Lopez-Mejia IC, Castillo-Armengol J, Lagarrigue S, Fajas L.** Role of cell cycle regulators in adipose tissue and whole body energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 7; 1-3. 2017

**Lubrano V and Balzan S.** Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med*. 5; 218-24. 2015

**Luo H, Liu B, Zhao L, He J, Li T, Zha L, Li X, Qi Q, Liu Y, Yu Z.** Galectin-3 mediates pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 11; 673-683.e3. 2017

**Lupo E, Locher R, Weisser B, Vetter W.** In vitro antioxidant activity of calcium antagonists against LDL oxidation compared with alpha-tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun*. 203;1803–8. 1994

**Lushchak VI.** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 224: 164 - 75. 2014

**Lu Z, Xu X, Hu X, Lee S, Traverse JH, Zhu G, Fassett J, Tao Y, Zhang P, dos Remedios C, Pritzker M, Hall JL, Garry DJ, Chen Y.** Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation*. 121; 1474–83. 2010

**Ma L and Chung WK.** The genetic basis of pulmonary arterial hypertension. *Hum Genet* 133; 471–9. 2014

**Mackie AR and Byron KL.** Cardiovascular KCNQ (Kv7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention. *Mol Pharmacol*. 74; 1171-9. 2008



**MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S.** 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Am J Pharmacol.* 131; 161-8. 2000

**MacLean MR, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M, Morecroft I.** 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *BJP.* 5; 917-930. 1996

**MacLean MR.** Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now?. *Int J Clin Pract.* 61; 27-31. 2007

**Mahmud FH, Earing MG, Lee RA, Lteif AN, Driscoll DJ, Lerman A.** Altered endothelial function in asymptomatic male adolescents with type 1 diabetes. *Congenit Heart Dis.* 1; 98–103. 2006

**Majed BH and Khalil RA.** Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn. *Pharmacol Rev* 64:540–582, 2012

Masaki T. Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol Sci.* 25; 219-224. 2004

**Matsuo Y, Kuwabara M, Tanaka-Totoribe N, Kanai T, Nakamura E, Gamoh S, Suzuki A, Asada Y, Hisa H, Yamamoto R.** The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412; 323–327. 2011

**McClennon J.** Diabetic foot ulcer. *Br J Nurs.* 26; S27-S28. 2017

**Mellor H and Parker PJ.** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332; 281-92. 1998

**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. *Circ.* 105; 2398-2403. 2002

**Minkin R, Sandhu G, Grosu H, Tartell L, Ma S, Lin YY, Eden E, Turino GM.** Desmosine and isodesmosine as a novel biomarker for pulmonary arterial hypertension: a pilot study. *Am J Ther.* 2015.

**Moral-Sanz J, López, JG.; Moral J, Frazziano G, Gomez M J, Moreno L, Menendez C, Flores J, Lorente JA, Cogolludo A, Pérez-Vizcaino, F.** Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats. *Exp Physiol.* 97; 676-86. 2012

**Morecroft I, Dempsie Y, Bader M, Walther DJ, Kotnik K, Loughlin L, Nilsen M, MacLean MR.** Effect of Tryptophan Hydroxylase 1 Deficiency on the Development of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Hypertension.* 49; 232 - 236. 2007

**Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, Kirk A, MacLean MR.** 5-hydroxytryptamine receptor mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Br J Pharmacol.* 128; 730-4. 1999

**Moreno L, Begoña L and cols.**

**Moreno L, Losada B, Cogolludo A, Lodi F, Lugnier C, Villamor E, Moro M, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F.** Postnatal Maturation of Phosphodiesterase 5 (PDE5) in Piglet Pulmonary Arteries: Activity, Expression, Effects of PDE5 Inhibitors, and Role of the Nitric Oxide/Cyclic GMP Pathway. *Pediatr Res* 56: 563–570, 2004

**Monjaraz E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F.** Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 295; L727-L732. 2008

**Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK.** Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54; 20–31. 2009

**Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G.** Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- $\kappa$ B-dependent fashion. *J Clin Invest.* 101; 1905–1915. 1998

**Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL.** The role of  $K^+$  channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation.* 13; 615-32. 2006

**Moule SK and Denton RM.** The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells. *FEBS Lett* 439:287–290, 1998

**Movahed MR, Hashemzadeh M, Jamal MM.** The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus. *Chest.* 128, 3568-3571. 2005

**Murray AR, Kisin E, Castranova V, Kommineni C, Gunther MR, Shvedova AA.** Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chem Res Toxicol.* 20; 1769-77. 2007

**Murray, Granner, Rodwell, Harper.** *Bioquímica ilustrada.* 17 ed. El manual moderno. México. 2007

**Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St Aubin C, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR, Michelakis ED.** Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation.* 116; 238–48. 2007

**National Center for Environmental Health.** *Aflatoxins, Understanding Chemical Exposures.* Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2012

**Neto-Neves EM, Frump AL, Vayl A, Kline JA, Lahm T.** Isolated heart model demonstrates evidence of contractile and diastolic dysfunction in right ventricles from rats with sugen/hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Physiol Rep.* 5; e13438. 2017

**Nishizuka Y.** Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J.* 9 (7): 484-96. 1995

**Nordgaard JC , Kruse LS, Gammeltoft S, Kruuse CR.** Role of Ser102 and Ser104 as Regulators of cGMP Hydrolysis by PDE5A. *PLoS One.* 23; e107627. 2014

**O'Connell JC, McCallum JF, McPhee I, Wakefield J, Houslay ES, Wishart W, Bolger G, Frame M, Houslay MD.** The SH3 domain of src tyrosyl protein kinase interacts with the N-terminal splice region of the PDE4A cAMP-specific phosphodiesterase RPDE-6 (RNPDE4A5). *Biochem. J.* 318, 255-262. 1996

**Oeckler RA, Arcuino E, Ahmad M, Olson SC, Wolin MS.** Cytosolic NADH redox and thiol oxidation regulate pulmonary arterial force through ERK MAP kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288; L1017-L1025. 2005

**Offermanns S.** Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. *Circ Res.* 99: 1293-1304, 2006

**Olschewski A, Hong Z, Peterson DA, Nelson DP, Porter VA, Weir EK.** Opposite effects of redox status on membrane potential, cytosolic calcium, and tone in pulmonary arteries and ductus arteriosus. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286; L15-L22. 2003

**Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W.** Aerosolized Iloprost Randomized Study Group: Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 347; 322–9. 2002

**Osinski MT, Rauch BH, Schrör K.** Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol.* 59; 1044-50. 2001

**Oudot A, Behr-Roussel D, Le Coz O, Poirier S, Bernabe J, Alexandre L, Giuliano F.** How does chronic sildenafil prevent vascular oxidative stress in insulin-resistant rats? *J Sex Med.* 7; 79–88. 2010

**Pai VP and Marshall AM.** Intraluminal volume homeostasis. A common serotonergic mechanism among diverse epithelia. *Commun Integr Biol.* 4; 532–537. 2011

**Paramothayan S and Lasserson T.** Treatments for pulmonary sarcoidosis. *Res Med.* 102; 1-9. 2008

**Patil CS, Singh VP, Singh S, Kulkarni SK.** Modulatory effect of the PDE-5 inhibitor sildenafil in diabetic neuropathy. *Pharmacology.* 72; 190–195. 2004

**Patrono C.** Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br J Clin Pharmacol.* 82; 957-64. 2016

**Pedersen SB, Lund S, Buhl ES, Richelsen B.** Insulin and contraction directly stimulate UCP2 and UCP3 mRNA expression in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 283:19 –25, 2001

**Pedyala S, Gors Gorshkova IA, Usatyuk PV, He D, Pennathur A, Lambeth AJ, Thannickal VJ, Natarajan V.** Role of Nox4 and Nox2 in Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Migration of Human Lung Endothelial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling.* 11; 747-764. 2009

**Perez-Vizcaino F, Cogollugo A, Moreno L.** Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 174; 212-220. 2010

**Pérez-Vizcaino F, López-López JG, Santiago R, Cogolludo A, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, Alonso MJ, Salaces M, Tamargo J.** Postnatal maturation in nitric oxide-induced pulmonary artery relaxation involving cyclooxygenase-1 activity. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 238; L839-L848. 2002

**Piatti PM, Marone E, Mantero M, Setola E, Galluccio E, Lucotti P, Shehaj E, Villa V, Perticone F, Venturini M, Palini A, Airoidi F, Faglia E, Del Maschio A, Colombo A, Chiesa R, Bosi E, Monti LD.** Effect of normalization of fasting glucose by intensified insulin therapy and influence of eNOS polymorphisms on the incidence of restenosis after peripheral angioplasty in patients with type 2 diabetes: a randomized, open-label clinical trial. *Acta Diabetol.* 50; 373-82. 2013

**Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR.** Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1 responsive promoters in mammalian cells. *FASEB J.* 9, 552-558. 1995

**Pofi R, Fiore D, De Gaetano R, Panio G, Gianfrilli D, Pozza C, Barbagallo F, Xiang YK, Giannakakis K, Morano S, Lenzi A, Naro F, Isidori AM, Venneri MA.** Phosphodiesterase-5 inhibition preserves renal hemodynamics and function in mice with diabetic kidney disease by modulating miR-22 and BMP7. *Sci Rep.* 7:44584. 2015

**Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Bito V, Van den Bergh A, Lenaerts I, Busch C, Marsboom G, Gheysens O, Vermeersch P, Biesmans L, Liu X, Gillijns H, Pellens M, Van Lommel A, Buys E, Schoonjans L, Vanhaecke J, Verbeken E, Sipido K, Herijgers P, Bloch KD, Janssens SP.** Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 119; 408–16. 2009

**Pomilio M, Mohn A, Verrotti A, Chiarelli F.** Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 15; 343–361. 2002

**Potus F, Ruffenach G, Dahou A, Thebault C, Breuils-Bonnet S, Tremblay È, Nadeau V, Paradis R, Graydon C, Wong R, Johnson I, Paulin R, Lajoie AC, Perron J, Charbonneau E, Joubert P, Pibarot P, Michelakis ED, Provencher S, Bonnet S.** Downregulation of microRNA-126 contributes to the failing right ven-tricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 132; 932–43. 2015

**Pourmahram GE, Snetkov A, Shaifita Y, Drndarski S, Knock GA, Aaronson PI, Ward J.** Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of Ca<sup>2+</sup> release and PKC. *Free Radical Biology and Medicine.* 15; 1468-1476. 2008

**Pradhan K, Sydykov A, Tian X, Mamazhakypov A, Neupane B, Luitel H, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Kretschmer A, Stasch JP, Ghofrani HA, Schermuly RT.** Soluble guanylate cyclase stimulator riociguat and phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil ameliorate pulmonary hypertension due to left heart disease in mice. *Int J Cardiol.* 6; 216:85-91, 2016

**Prasad VS, Palaniswamy C, Frishman W.** Endothelin as a clinical target in the treatment of systemic hypertension. *Cardiol Rev.* 17; 181-191. 2009

**Puri A, McGoon MD, Kushwaha SS.** Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 4; 319-29. 2007

**Rabinovitch M.** Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 118; 2372–2379. 2008

**Radomski AD.** The nitric oxide – endothelin -1 connection. *Heart Fail Rev.* 8; 107-115. 2003

**Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD.** Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90; 2542–2546. 1993

**Ramani GV and Park MH.** Update on the clinical utility of sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther.* 4; 61–70. 2010

**Rameh V and Kossaify A.** Role of Biomarkers in the Diagnosis, Risk Assessment, and Management of Pulmonary Hypertension. *Biomark Insights.* 11; 85–89. 2016

**Remillard CV and Yuan JX.** Activation of K<sup>+</sup> channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286; L49-67. 2004

**Rathore R, Zheng YM, Niu CF, Liu QH, Korde A, HoYS, Wang YX.** Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> through the mitochondrial ROS-PKC $\epsilon$  signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 45; 1223-1231. 2008

**Reeve HL, Archer SL, Weir EK.** Dexfenfluramine increases pulmonary smooth muscle intracellular Ca<sup>2+</sup> independent of membrane potential. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 277; L662-6. 1999

**Reeve HL, Archer SL, Weir EK.** Dexfenfluramine releases intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation.* 98; 341. 1998

**Rehman J and Archer SL.** A proposed mitochondrial–metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in Fawn–Hooded rats: the Warburg model of pulmonary arterial hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 661:171–185. 2010

**Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller, Tada Y, Kai-Xun L, Cool C, Fagan K, Cribbs L.** Low-Voltage–Activated (T-Type) Calcium Channels Control Proliferation of Human Pulmonary Artery Myocytes. *Circ Res.* 96; 864-872. 2005

**Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Sanchez-López E, Plaza JJ, Egido J.** Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 97; 125-34. 2005

**Rondelet B, Kerbaul F, Van Beneden R, Motte S, Fesler P, Hubloue I, Rummelink M, Brimiouille S, Salmon I, Ketelslegers JM, Naeije R.** Signaling Molecules in Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension in Piglets. Effects of Sildenafil Therapy. *Circulation.* 110; 2220-2225. 2004

**Rosano GM, Aversa A, Vitale C, Fabbri A, Fini M, Spera G.** Chronic treatment with tadalafil improves endothelial function in men with increased cardiovascular risk. *Eur Urol.* 47; 214–220. 2005

**Rosenstock J, Challis P, Strowig S, Raskin P.** Improved diabetes control reduces skeletal muscle capillary basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 4; 167–175. 1988

**Rothman RB, Ayestas MA, Derchs CM, Baumann MH.** Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates - implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 100; 869-75. 1999

**Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, Galiè N, Simonneau G, Ghofrani HA, Oakes M, Layton G, Serdarevic-Pehar M, McLaughlin VV, Barst RJ.** Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest.* 140:1274-83. 2011

**Russo I, Del Mese P, Doronzo G, Mattiello L, Viretto M, Bosia A, Anfossi G, Trovati M.** Resistance to the Nitric Oxide/Cyclic Guanosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase G Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells from the Obese Zucker Rat, a Classical Animal Model of Insulin Resistance: Role of Oxidative Stress. *Endocrinology.* 149; 1480 –1489. 2008

**Sajan MP, Hansen BC, Higgs MG, Kahn CR, Braun U, Leitges M, Park CR, Diamond DM, Farese RV.** Atypical PKC, PKC $\delta$ , activates  $\beta$ -secretase and increases A $\beta$ 1-40/42 and phospho-tau in mouse brain and isolated neuronal cells, and may link hyperinsulinemia and other aPKC activators to development of pathological and memory abnormalities in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* S0197-4580; 30294-4. 2017

**Salter KJ, Wilson CM, Kato K, Kozlowski RZ.** Endothelin-1, Delayed Rectifier K Channels, and Pulmonary Arterial Smooth Muscle J *Cardiovasc Pharmacol:* 31; S81-S83. 1998

**Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS.** Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Am Coll Cardiol.* 43; 1149-53. 2004

**Satoh K, Berk BC, Shimokawa H.** Vascular-derived reactive oxygen species for homeostasis and diseases. *Nitric Oxide.* 25; 211-5. 2011

**Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J.** Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *J Vasc Res.* 44; 375-81. 2007

**Scheider MP, Boesen E, Pollock DM.** Contrasting actions of endothelin ETA and ETB receptor in cardiovascular disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47; 731-759. 2007

**Schröder E and Eaton P.** Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8; 153-159. 2008.

**Secretaría de salud.** México. Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar primaria en el adulto. 2010

**Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK.** Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ. Res.* 91; 406-413. 2002

**Seyfarth HJ, Sack U, Gessner C, Wirtz H.** Angiogenin, FGF- $\beta$  and VEGF: angiogenic markers in breath condensate of patients with pulmonary hypertension. *Pneumologie.* 69; 207–11. 2015

**Shan X, Quaile MP, Monk JK, French B, Cappola TP, Margulies KB.** Differential Expression of PDE5 in Failing and Non-Failing Human Myocardium. *Circ Heart Fail.* 5; 79-86. 2012

**Shimoni Y, Ewart HS, Severson D.** Insulin stimulation of rat ventricular K<sup>+</sup> currents depends on the integrity of the cytoskeleton. *J Physiol.* 514; 735-45. 1999

Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 10, 699-707. 1997

**Sikandaneer HE, Park SY, Kim MJ, Park SN, Yang DW.** Neuroprotective effects of sildenafil against oxidative stress and memory dysfunction in mice exposed to noise stress. *Behav Brain Res.* 319; 37-47. 2017

**Singh P, Jain A, Kaur G.** Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem.* 260:153–159. 2004

**Singh TP, Groehn H, Kazmers A.** Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 41; 661–665. 2003

**Smirnov SV and Aaronson PI.** Modulatory effects of arachidonic acid on the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat pulmonary arterial myocytes. Structural aspects and involvement of protein kinase C. *Circ Res.* 79; 20-31. 1996

**Smith MJ, Simmons KM, Cambier JC.** B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 13; 712-720. 2017

**Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW.** Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 122; 920–7. 2010

**Srinivas NR.** Strategies for preclinical pharmacokinetic investigation in streptozotocin-induced diabetes mellitus (DMIS) and alloxan-induced diabetes mellitus (DMIA) rat models: case studies and perspectives. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 40; 1-12. 2014

**Stowe DF and Camara AK.** Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxid Redox Signal.* 11; 1373-1414. 2009

**Sung BJ, Hwang KY, Jeon YH, Lee JI, Heo YS, Kim JH, Moon J, Yoon JM, Hyun YL, Kim E, Eum SJ, Park SY, Lee JO, Lee TG, Ro S, Cho JM.** Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature* 425; 98-102. 2003

**Szkudelski T.** Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* 237; 481-490. 2012

**Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA.** Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 11; 214–22. 2005

**Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, Branzi A, Galié N.** Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 100; 131-8. 2005

**Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E.** Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales?. *Rev Esp Cardiol Supl.* 6; 10-24. 2006

**Tamargo J.** Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Med Clin (Barc).* 114; S6-12. 2000

**Thakkar N, Gonzalez D, Cohen-Wolkowicz M, Massaro MM, Bernhardt J, Zane NR, Laughon MM.** An opportunistic study evaluating pharmacokinetics of sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in infants. *J Perinatol.* 2016

**Tiede SL, Wassenberg M, Christ K, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA, Gall H.** Biomarkers of tissue remodeling predict survival in patients with pulmonary hypertension. *International Journal of Cardiology.* 223; 821–826. 2016

**Toque HA, Fernandez-Flores A, Mohamed R, Caldwell RB, Ramesh G, Caldwell RW.** Netrin-1 is a novel regulator of vascular endothelial function in diabetes. *PLoS One.* 12; e0186734. 2017

**Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW.** Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62; D4-12. 2013

**Uauy R, Martínez JI, Rojas CV.** Molecular nutrition, role of the PPAR system in lipidic metabolism and its importance in obesity and diabetes mellitus. *Rev Med Chil.* 128; 437-46. 2000

**Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griending KK.** Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274; 22699-22704. 1999

**van Der Mieren G, Nevelsteen I, Vanderper A, Oosterlinck W, Flameng W, Herijgers P.** Angiotensin-converting enzyme inhibition and food restriction in diabetic mice do not correct the increased sensitivity for ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Diabetol.* 11; 89. 2012



**van Wolferen SA, Marcus JT, Westerhof N, Spreeuwenberg MD, Marques KM, Bronzwaer JG, Henkens IR, Gan CT, Boonstra A, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A.** Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J.* 29; 120–7. 2008

**Varma A, Das A, Hoke NN, Durrant DE, Salloum FN, Kukreja RC.** Anti-inflammatory and cardioprotective effects of tadalafil in diabetic mice. *PLoS One.* 7; e45243. 2012

**Varo N, Vicent D, Libby P, Nuzzo R, Calle-Pascual AL, Bernal MR, Fernandez-Cruz A, Veves A, Jarolim P, Varo JJ, Goldfine A, Horton E, Schonbeck U.** Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation.* 107; 2664–2669. 2003

**Varvarovská J, Racek J, Stetina R, Sýkora J, Pomahacová R, Rusavý Z, Lacigová S, Trefil L, Siala K, Stozický F.** Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 58; 539–545. 2004

**Vickers SP, Hackett D, Murray F, Hutson PH, Heal DJ.** Effects of lisdexamfetamine in a rat model of binge-eating. *J. Psychopharmacol.* 29; 1290-1307. 2015

**Villamor E, Le Cras TD, Horan MP, Halbower AC, Tudor RM, Abman SH.** Chronic intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelial nitric oxide synthase in the ovine fetus. *Am J Physiol.* 272; L1013-20. 1997

**Villegas L, Stidham T, Nozik-Grayck E.** Oxidative Stress and Therapeutic Development in Lung Diseases. *J Pulm Respir Med.* 4; 194. 2014

**Vita JA and Keaney JF.** Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 106; 640–642. 2002

**von Siebenthal C, Aubert J-D, Mitsakis P, Yerly P, Prior JO, Nicod LP.** Pulmonary Hypertension and Indicators of Right Ventricular Function. *Front. Med.* 3:23. 2016

**Walch L, Gascard JP, Dulmet E, Brink C, Norel X.** Evidence for a M1 muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol.* 130; 73–78. 2000

**Walther DJ and Bader MA.** Unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66; 1673–1680. 2003

**Wang J, Alexanian A, Ying R, Kizhakekuttu TJ, Dharmashankar K, Vasquez-Vivar J, Gutterman DD, Widlansky ME.** Acute exposure to low glucose rapidly induces endothelial dysfunction and mitochondrial oxidative stress: role for AMP kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32; 712–720. 2013

**Wang HX, Wang X, Shi MJ, Li S, Liu T, Zhang XH.** Systematic review and meta-analysis on phosphodiesterase 5 inhibitors and  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists used alone or combined for treatment of LUTS due to BPH. *Asian Journal of Andrology.* 17; 1022–1032. 2015

**Watts S. and Davis R.** 5-hydroxitriptamine receptors in systemic hypertension: an arterial focus. *Cardiovasc Ther.* 29; 54-67. 2011

**Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D, Schumacker PT.** Hypoxia Triggers Subcellular Compartmental Redox Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 106; 526-535. 2010

**Wedgwood S, Dettman RW, Black SM.** ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. 281; L1058-L1067. 2001

**Weksler BB.** Prostanoids and NSAIDs in cardiovascular biology and disease. *Curr Atheroscler Rep.* 17; 41. 2015

**Welford RW, Vercauteren M, Trébaul A, Cattaneo C, Eckert D, Garzotti M, Sieber P, Segrestaa J, Studer R, Groenen PM, Nayler O.** Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation. *Sci Rep.* 6; 30059. 2016.

**Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, Peacock AJ.** Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor and transporter. *Am J Respir Crit Care Med.* 170; 252-9. 2004

**West JD, Voss BM, Pavliv L, de Caestecker M, Hemnes AR, Carrier EJ.** Antagonism of the thromboxane-prostanoid receptor is cardioprotective against right ventricular pressure overload. *Pulm Circ.* 6; 211-23. 2016

**Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA.** Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circ.* 17; 1695–1701. 1998.

**Wilson C, Lee MD, McCarron JG.** Acetylcholine released by endothelial cells facilitates flow-mediated dilatation. *J Physiol.* 594; 7267–7307. 2016

**Wright RJ and Frier BM.** Vascular disease and diabetes: is hypoglycaemia an aggravating factor? *Diabetes Metab Res Rev.* 24:353–363. 2008

**Yamamura A, Yamamura H, Guo Q, Zimnicka AM, Wan J, Ko EA, Smith KA, Pohl NM, Song S, Zeifman A, Makino A, Yuan JX.** Dihydropyridine Ca<sup>(2+)</sup> channel blockers increase cytosolic [Ca<sup>(2+)</sup>] by activating Ca<sup>(2+)</sup>-sensing receptors in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res.* 112; 640-50. 2013

**Yoshimura K and Sokabe M.** Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interactions. *J R Soc Interface.* 7; S307-20. 2010

**Yoon DY, Mansukhani NA, Stubbs VC, Helenowski IB, Woodruff TK, Kibbe MR.** Sex bias exists in basic science and translational surgical research. *Surgery.* 156; 508–516. 2014

**Yoopan N, Watcharasit P, Wongsawatkul O, Piyachaturawat P, Satayavivad J.** Toxicol. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Lett.* 176; 157-61, 2008

**Yoshimura K and Sokabe M.** Mechanosensitivity of ion channels based on protein–lipid interactions. *J. R. Soc. Interface.* 7; S307–S320. 2010

- Yu W, Ji W, Mi L, Lin C.** Mechanisms of N-acetylcysteine in reducing monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: Inhibiting the expression of Nox1 in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 16; 6148-6155. 2017
- Yuhki KI, Miyauchi T, Kakinuma Y, Murakoshi N, Maeda S, Goto K, Yamaguchi I, Suzuki T.** Endothelin-1 production is enhanced by rotenone, a mitochondrial complex I inhibitor, in cultured rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38; 850-8. 2001
- Zelko IN and Folz RJ.** Extracellular superoxide dismutase functions as a major repressor of hypoxia-induced erythropoietin gene expression. *Endocrinology.* 146; 332-40. 2005
- Zhang M and Kass DA.** Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol Sci.* 32; 360–365. 2011
- Zhao Y, Vanhoutte PM, Susan WS.** Leung. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129, 83e94. 2015
- Zhonglin X, Junhua Z, Jiliang W, Benoit V, Ming-Hui Z.** Upregulation of Mitochondrial Uncoupling Protein-2 by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells Attenuates Oxidative Stress in Diabetes. *Diabetes* 57:3222–3230, 2008
- Ziukaite L, Slot DE, Van der Weijden FA.** Prevalence of Diabetes Mellitus in People Clinically Diagnosed with Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Epidemiologic Studies. *J Clin Periodontol.* 2017
- Zou MH, Hou XY, Shi CM, Kirkpatrick S, Liu F, Goldman MH, Cohen RA.** Activation of 5<sub>α</sub>-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells: role of peroxynitrite. *J Biol Chem* 278:34003–34010, 2003
- Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Brownlee M, Wiles WG.** Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin is mediated through mitochondrial reactive oxygen species and PI-3 kinase. *J Biol Chem* 279:43940–43951, 2004