



## Atualização

# Hipertensão Arterial Pulmonar. Fisiopatologia, Aspectos Genéticos e Resposta ao Uso Crônico do Sildenafil

*Pulmonary Arterial Hypertension. Physiopathology, Genetic Aspects and Response to the Chronic use of Sildenafil*

Alessandra Costa Barreto, Sônia Meiken Franchi, Alexandre C. Pereira, Antonio Augusto Lopes  
Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - FMUSP - São Paulo, SP

Nas últimas décadas, tem havido crescente interesse pelo entendimento dos mecanismos fisiopatológicos operantes na hipertensão pulmonar, sobretudo na hipertensão arterial pulmonar (HAP). Os progressos têm sido mais evidentes com relação à assim chamada HAP idiopática (esporádica e familiar, anteriormente chamada de hipertensão pulmonar primária). Genes foram identificados cujas alterações podem estar relacionadas ao desencadeamento da doença (*bone morphogenetic protein type 2 receptor*, BMPR2). Outros genes têm sido identificados como facilitadores (transportador da serotonina). Além disso, a partir de estudos em modelos animais e cultivo celular, uma série de alterações biológicas tem sido identificada. Essas alterações envolvem células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos, matriz extracelular, proteólise pericelular, fatores de crescimento e seus receptores, entre outros. A presente revisão tem como objetivo identificar as principais alterações fisiopatológicas conhecidas na HAP até o momento. Além disso, são apresentadas duas famílias com HAP, com o objetivo de enfatizar a importância do diagnóstico genético e chamar a atenção para as vias de sinalização (óxido nítrico/GMP cíclico), hoje utilizadas em intervenções terapêuticas (sildenafil, uso crônico).

## Introdução

A hipertensão pulmonar é uma síndrome clínica e hemodinâmica, que resulta no aumento da resistência vascular na pequena circulação, em geral por mecanismos mistos, envolvendo vasoconstrição e remodelagem da parede arterial (arteriolar)<sup>1</sup>. A classificação mais recente da hipertensão pulmonar<sup>2</sup> inclui cinco itens, dos quais o primeiro recebe a designação de hipertensão arterial pulmonar (HAP). Nesta forma de apresentação estão incluídas entidades semelhantes sob o ponto de vista fisiopatológico, como por exemplo a HAP idiopática, a familiar e a associada a cardiopatias congênitas.

A compreensão dos mecanismos etiopatogênicos e fisiopatológicos operantes na HAP progrediu significativamente nas últi-

mas décadas e tem sido a razão do desenvolvimento de novos recursos terapêuticos. Assim sendo, o objetivo da presente atualização é apresentar os conceitos mais recentes acerca da fisiopatologia da HAP. Em seguida, são apresentadas duas famílias, com a intenção de ressaltar mecanismos ligados à gênese da doença e ainda outros, implicados com a resposta à intervenção terapêutica.

## Alterações do tônus vascular pulmonar: vasoconstrição pulmonar por hipóxia

Há estudos que demonstram uma tendência à vasoconstrição na HAP. O aumento na produção de tromboxane A<sub>2</sub>, um vasoconstritor, bem como a produção deficiente de prostaciclina, vasodilatador, são achados em pacientes com a forma idiopática da HAP. Um outro exemplo desse desequilíbrio, relacionado à disfunção endotelial, é a demonstração de expressão reduzida da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e expressão aumentada de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor<sup>3,4,5</sup>.

A maioria dos eventos que levam à vasoconstrição na HAP, em última análise, fazem-no através do aumento de cálcio nas células musculares lisas vasculares. A forma mais exhaustivamente estudada de aumento do tônus na pequena circulação é a vasoconstrição pulmonar por hipóxia. A redução na tensão alveolar de oxigênio promove uma elevação rápida e reversível da resistência vascular pulmonar, que se inicia com menos de um minuto, revertendo rapidamente com a normalização das condições de oxigenação<sup>6</sup>. O mecanismo que inicia a vasoconstrição é a inibição de vários canais de potássio, designados por K<sub>v</sub>, seguida de despolarização da membrana celular e entrada de cálcio através dos canais tipo L. Essa é uma resposta única da vasculatura pulmonar, em contraste à resposta vasodilatadora sistêmica frente à hipóxia. Além disso, há evidências de que os canais de cálcio tipo L possam ser diretamente influenciados pela hipóxia<sup>7</sup>. A vasoconstrição pulmonar é, em condições normais, um mecanismo adaptativo com a finalidade de equilibrar a ventilação e a perfusão, restringindo o fluxo sanguíneo em áreas pouco ventiladas (como, por exemplo, nas atelectasias) em favor de áreas de melhor ventilação. O mecanismo preciso da vasoconstrição não está bem esclarecido, mas acredita-se no envolvimento de diversos fatores (provavelmente diferentes na hipóxia aguda e crônica) sempre resultando em despolarização da membrana e aumento do cálcio intrace-

Correspondência: Antonio Augusto Lopes - InCor - Cardiologia  
Pediátrica e Cardiopatias Congênitas do Adulto - Av. Dr. Eneas de  
Carvalho Aguiar, 44 - 05403-000 - São Paulo, SP  
E-mail: aablopes@usp.br  
Enviado em: 02/03/2005 - Aceito em: 04/04/2005

lular. Apesar de evidências confirmando esta hipótese, alguns autores creem ser este apenas um mecanismo facilitador, e não o mediador principal da vasoconstrição<sup>7</sup>.

Uma teoria complementar para a vasoconstrição pulmonar por hipóxia sugere a participação de mecanismos "redox" na célula muscular lisa. Em condições normais, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias manteria um "estado oxidado" dos canais de potássio, que permaneceriam abertos. Durante a hipóxia, o transporte de elétrons mitocondrial está reduzido, bem como a geração de ERO. O conseqüente "estado reduzido" do citosol resultaria na inibição dos canais de potássio e despolarização da membrana celular<sup>7,8</sup>. De forma alternativa, o sistema "sensor" de oxigênio poderia não estar nas mitocôndrias, mas sim junto à membrana plasmática, representado por NADPH oxidases ou enzimas similares. Outra possibilidade é que a hipóxia module as correntes de potássio nos  $K_v$  através da atividade do citocromo P450. Estudos que envolveram sua inibição demonstraram queda na corrente de potássio, causando despolarização da membrana celular<sup>8</sup>.

Em relação à hipóxia crônica, os mecanismos causadores da vasoconstrição pulmonar podem ser diversos. A atividade dos canais  $K_v$  pode estar limitada por redução na transcrição dos seus genes. Em ratos, a hipóxia crônica diminui a expressão de RNAm e proteína da subunidade- $\alpha$  dos canais de potássio em células musculares lisas, causando um decréscimo funcional dos mesmos<sup>8</sup>. Além disso, a privação de oxigênio aumenta a atividade funcional do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1). Em condições de tensão normal de oxigênio a subunidade- $\alpha$  deste transativador é degradada. Em hipóxia, porém, a degradação é inibida, havendo acúmulo de HIF-1 $\alpha$ , dimerização com HIF-1 $\beta$  e formação de HIF-1 funcional. Este é responsável pela ativação de genes críticos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a ET-1<sup>8</sup>.

Uma característica particular em pacientes com a forma idiopática da HAP é a redução no número de canais de potássio funcionantes. Alterações nos canais de potássio foram encontradas em células musculares lisas destes pacientes, mas não em outras formas de HAP. Comparando-se indivíduos normais com portadores de hipertensão arterial sistêmica, HAP associada a outras doenças e HAP idiopática, verificou-se que as células musculares lisas deste último grupo apresentaram expressão reduzida de subunidades dos canais  $K_v$ <sup>9</sup>. Isto acarretaria um decréscimo nas correntes de potássio, permitindo a entrada de cálcio e vasoconstrição pulmonar sustentada.

## Proliferação celular e alteração da matriz no remodelamento vascular pulmonar

A seguir, passamos à discussão de alguns mecanismos relacionados à remodelagem vascular pulmonar. Esses mecanismos envolvem fatores de crescimento, matriz extracelular, receptores de membrana e atividades proteolíticas.

Dentre os fatores de crescimento e seus receptores, a superfamília TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) é de especial relevância na gênese da HAP, pois exerce papel importante em processos fisiológicos de inflamação, imunidade e diferenciação e proliferação celular. É composta por mediadores multifuncionais, incluindo TGF- $\beta$  e BMP (*bone morphogenetic proteins*). Estudos demonstram que pacientes com a forma idiopática da HAP apresentam

alteração no receptor tipo 2 do BMP (BMPR2), mais precisamente mutações no gene que o codifica e que está localizado no cromossomo 2q33<sup>10</sup>. O BMPR2 liga-se a citocinas como TGF- $\beta$ , BMP, ativina, inibina e outros fatores de crescimento e diferenciação. Ele exerce sua função de sinalização através da formação de um complexo heterodimérico na superfície celular, juntamente com o receptor do tipo 1. Ao ser ativado, este complexo inicia a sinalização dentro da célula através de enzimas específicas, conhecidas como Smad. Este sinal é translocado até o núcleo, onde irá regular a transcrição de genes. Mutações no BMPR2 causariam sinalização deficiente, acarretando a perda de mecanismos antiproliferativos, por exemplo, na circulação pulmonar. Já foi demonstrado que o BMPR2 tem sua expressão drasticamente reduzida na circulação pulmonar em pacientes com HAP idiopática, até mesmo nos indivíduos que não apresentam mutações deste receptor<sup>11</sup>.

O VEGF tem sido amplamente estudado, mais precisamente na HAP induzida por hipóxia. Liga-se com alta afinidade a dois receptores do tipo tirosina-quinase: VEGFR-1 e VEGFR-2. Por ser mitógeno de células endoteliais, está envolvido no crescimento das mesmas, por exemplo, no interior das assim chamadas lesões plexiformes<sup>12</sup>. A hipóxia crônica, que acompanha algumas formas de HAP, cursa com aumento da expressão do VEGF e de seus receptores<sup>13</sup>. Outros fatores de crescimento também são influenciados pela hipóxia, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de fibroblastos (FGF-2), insulina-símile (IGF-1) e o fator de crescimento epidérmico (EGF).

O óxido nítrico (NO), um vasodilatador derivado do endotélio, também tem ação antiproliferativa na musculatura lisa vascular<sup>14</sup>, possivelmente ligada à geração de GMP cíclico intracelular. Com efeito, tem sido cogitado que inibidores da enzima fosfodiesterase 5 (que degrada GMP cíclico) poderiam atuar sobre o remodelamento vascular pulmonar induzido por hipóxia<sup>15</sup>. Esta ação protetora do GMP cíclico estaria relacionada à via das MAPK quinases e à inibição do fator de transcrição AML1 (*acute myelogenous leukemia*)<sup>16</sup>.

A prostaciclina, semelhantemente ao NO, é um potente vasodilatador e inibidor da adesão plaquetária e crescimento celular. É o principal metabólito do ácido araquidônico no endotélio vascular, com ação na célula muscular lisa, através do aumento do AMP cíclico. Além disso, a prostaciclina inibe o efeito da endotelina-1 (ET-1). Pacientes com HAP apresentam síntese e excreção urinária diminuídas da prostaciclina<sup>4</sup>.

O papel da serotonina na HAP está relacionado à indução de hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas e efeito mitogênico também em células endoteliais e fibroblastos. A ação da serotonina na circulação pulmonar é ampla e envolve também a vasoconstrição, por exemplo, em resposta à hipóxia<sup>17</sup>. Níveis plasmáticos aumentados de serotonina são observados em algumas formas de HAP<sup>18</sup>. Além disso, a expressão aumentada de seu transportador poderia estar relacionada a acúmulo de serotonina intracelular<sup>19</sup>.

A ET-1 é um potente vasoconstritor produzido, predominantemente, pela célula endotelial, com ação mitogênica, inflamatória e de proliferação sobre a célula muscular lisa. Apesar de não existir estoques intracelulares de ET-1, estímulos específicos induzem sua síntese e secreção em minutos. Há dois tipos de receptores de endotelina: ET<sub>A</sub> (encontrados em células musculares lisas e miócitos cardíacos) e ET<sub>B</sub> (encontrados em células endoteliais e musculares lisas). A ligação da ET-1 aos seus receptores ativa a

enzima fosfolipase C, aumentando os níveis intracelulares de cálcio, o que resulta em vasoconstrição prolongada. O diacil-glicerol, produzido a partir da fosfolipase C ativada, estimula a proteína-quinase C, enzima mediadora da ação mitogênica da ET-1<sup>20</sup>. Semelhantemente à serotonina, a ação da ET-1 é potencializada na presença de outros fatores de crescimento<sup>21</sup>. Outros efeitos relevantes da ET-1 são a estimulação da produção de citocinas e fatores de crescimento<sup>22</sup>, a indução da formação de proteínas da matriz extracelular<sup>23</sup> e a potencialização dos efeitos do TGF- $\beta$  e PDGF<sup>21</sup>. Estudos em pulmões de ratos normais demonstraram níveis de RNAm da ET-1 cinco vezes maiores se comparados com qualquer outro órgão<sup>24</sup>. Em condições normais, os pulmões retiram ET-1 da circulação. Na HAP, os pulmões sintetizam ET-1 em quantidades aumentadas, o que resulta em aumento dos níveis circulantes, com implicações prognósticas<sup>3</sup>. Nessas condições, a circulação pulmonar passa a ser alvo desse peptídeo.

Além da atuação dos fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras na gênese do remodelamento vascular pulmonar, eventos envolvendo componentes da matriz extracelular são de extrema relevância (fig. 1). Neste sentido, propõe-se que alterações estruturais e funcionais do endotélio, conseqüentes a estímulos diversos, acabem permitindo que algum fator ou fatores presentes no plasma penetrem e se acumulem no subendotélio. Este fator (possivelmente a apolipoproteína A1 ou equivalente) contribuiria para o aumento de expressão da elastase vascular endógena (EVE), uma serino-protease que degrada a elastina e o colágeno e está aumentada na HAP de maneira proporcional à progressão da doen-

ça<sup>25</sup>. Acredita-se que a indução da EVE em células musculares lisas seja o resultado da interação da própria elastina, de sua proteína de ligação e de fatores séricos com a membrana celular. O processo de sinalização envolveria tirosina-quinases, a via das MAPP quinases e a ativação do fator de transcrição AML-1 (descrito e relacionado à etiopatogenia da leucemia mieloide aguda). Já foi demonstrado que esta sinalização, envolvendo o fator AML-1, pode ser inibida por ação do NO, através do GMP cíclico. Sugere-se, portanto, que o NO, via GMP cíclico, possa inibir o remodelamento da matriz vascular pulmonar pela supressão desta via de sinalização. A EVE, além da capacidade de degradar elastina, também degrada proteoglicanos que estocam fatores de crescimento como FGF-2 e TGF- $\beta$ <sup>25</sup>. Além disso, é capaz de promover a ativação de receptores para esses fatores, conforme ilustrado na Figura 1.

Os mecanismos descritos acima, de maneira resumida, constituem, na verdade, um modelo proposto de remodelamento vascular pulmonar a partir de vários estudos experimentais<sup>1</sup>. Compreende-se desta forma que o remodelamento vascular na HAP é um processo complexo que muito provavelmente envolve fatores séricos, indução de proteases, modificações da matriz extracelular, disponibilização de fatores de crescimento, ativação de seus receptores e, finalmente, mitose. Além disso, muitas alterações envolvendo matriz extracelular, integrinas e fatores de crescimento, contribuem para a alteração do fenótipo das células musculares lisas em vasos pulmonares, que ao perderem a característica contrátil, transformam-se em células secretoras e capazes de se movimentar em direção à camada íntima<sup>1</sup>.

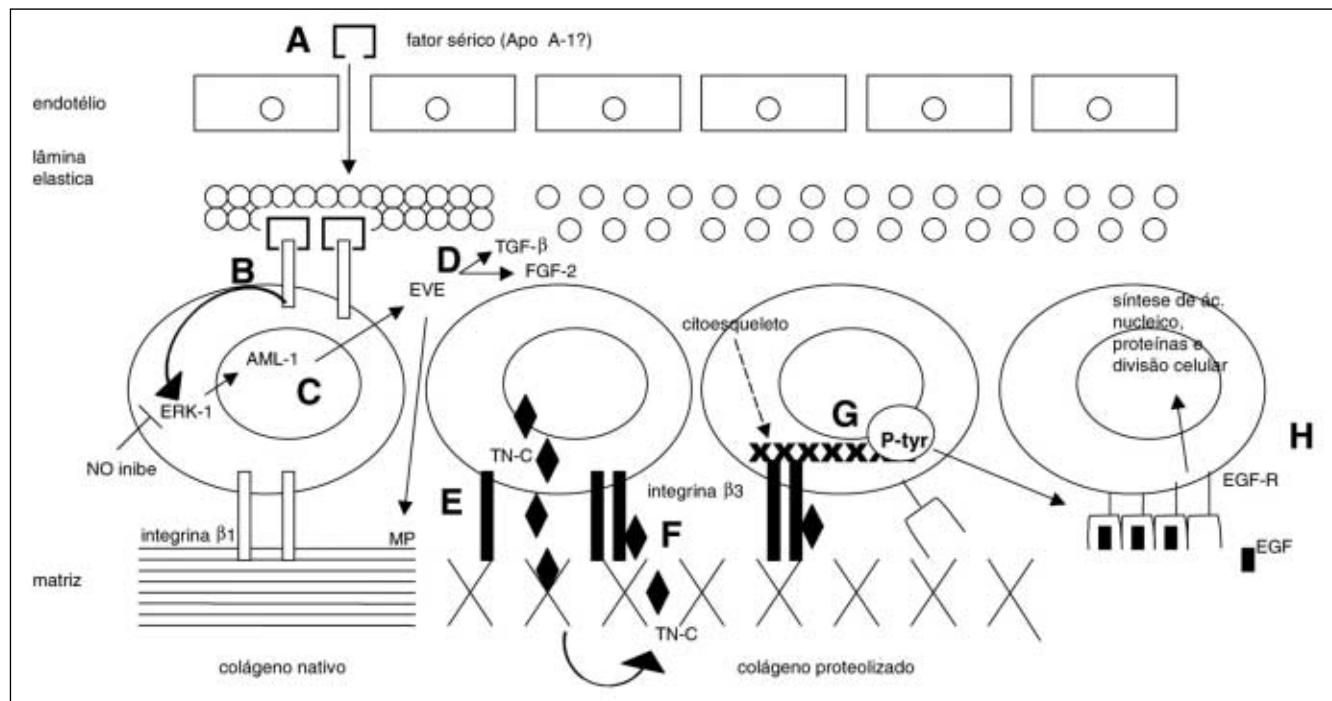


Fig. 1 - Esquema hipotético do processo de remodelagem vascular pulmonar, a partir da lesão endotelial até a indução dos mecanismos de divisão celular. Alterações estruturais/funcionais do endotélio resultam em perda da função de barreira, permitindo a penetração de fator sérico (presumivelmente a apolipoproteína A1, Apo A-1) (A). Esse facilitaria a interação entre a elastina e a superfície da célula muscular lisa, resultando em ativação de quinases intracelulares (B). Essa atividade envolve a fosforilação da ERK-1 (extracellular regulated kinase), cujo alvo parece ser o gene AML-1 (acute myelogenous leukemia), um fator de transcrição que induz a expressão do gene da elastase endógena (EVE) (C). Além de degradar a elastina, a EVE também degrada proteoglicanos que estocam fatores de crescimento, como FGF-2 e TGF- $\beta$  (D). Além disso, ela ativa metaloproteínas da matriz (MP), que degradam o colágeno do tipo I, expondo sítios de ligação de integrinas  $\beta$ 3 (E), cuja sinalização para dentro da célula induz a produção de tenascina-C (TN-C). A secreção desta e sua incorporação ao colágeno resultam em sinalização 'de fora para dentro', via integrinas  $\beta$ 3 (F e G). O resultado é a formação de complexos de adesão focal, organização do citoesqueleto e fosforilação em tirosina de diversas outras moléculas sinalizadoras (P-tyr) (G). Esta sinalização, envolvendo o citoesqueleto, induz a formação de conglomerados de receptores para fatores de crescimento (por exemplo, EGF-R), que ficam então prontos para serem ativados. Por fim, a ligação dos fatores de crescimento aos seus receptores induz a sinalização citoplasmática e nuclear, culminando com a síntese proteica e de ácidos nucleicos, e divisão celular (H).

## Disfunção endotelial: indução de mecanismos pró-coagulantes e pró-trombóticos

Além da participação expressiva do endotélio nas alterações do tônus e no remodelamento vascular pulmonar presentes na HAP, seu envolvimento no processo vaso-oclusivo propriamente dito torna-se relevante, uma vez que há perda progressiva de suas características anticoagulantes, antitrombóticas e antiaderentes, e desencadeamento de mecanismos que facilitam a coagulação e a adesão celular e inibem a fibrinólise.

Entre as substâncias de origem endotelial, que têm se mostrado alteradas na HAP com implicações nos mecanismos descritos, encontram-se a trombomodulina, o ativador tecidual do plasmínogênio (t-PA), seu inibidor (PAI-1), a selectina-P e o fator de Von Willebrand (FvW), além do óxido nítrico e da prostaciclina. Além disso, têm sido identificadas outras alterações pró-trombóticas, como a presença de anticorpos antifosfolípidos e a hiperhomocisteinemia.

A trombomodulina é um proteoglicano de membrana plasmática. Sua porção extracelular é clivada em várias regiões, com conseqüente liberação de fragmentos na corrente sanguínea, cuja concentração pode ser facilmente determinada. Esses fragmentos são conhecidos como a fração solúvel. A trombomodulina tem propriedades de ligação à trombina, o que ativa a proteína C que, por sua vez, degrada os fatores V e VIII da coagulação<sup>26</sup>. Em pacientes com HAP, os níveis plasmáticos de trombomodulina estão diminuídos, provavelmente como resultado de síntese endotelial reduzida<sup>26,27</sup>. Além disso, há relatos que demonstram baixos níveis plasmáticos de proteína C, assim como seu co-fator, a proteína S<sup>28</sup>. Essas alterações podem refletir uma síntese deficiente ou mesmo consumo por coagulação intravascular.

Pacientes com a síndrome antifosfolípide, associada ou não ao *lupus eritematosus* sistêmico, apresentam HAP com uma prevalência de 1,8 a 3,5%. Os anticorpos antifosfolípidos, cuja presença na circulação ocorre por mecanismos não totalmente esclarecidos, parecem promover o surgimento de trombose por vários mecanismos<sup>29,30</sup>. O tromboembolismo pulmonar parece ser a principal causa de HAP na síndrome<sup>31</sup>. Por outro lado, 10 a 20% dos pacientes com tromboembolismo crônico apresentam tais anticorpos<sup>32</sup>. Há ainda relatos da presença dos mesmos em indivíduos com HAP aparentemente idiopática, na ausência de outros sinais comprobatórios de tromboembolismo crônico<sup>33</sup>.

A homocisteína é um aminoácido que, em indivíduos normais, pode facilitar a coagulação e adesão celular. Sabe-se que a presença de níveis plasmáticos elevados de homocisteína está associada à disfunção endotelial e plaquetária, com conseqüente formação de trombos e vasoconstrição<sup>34</sup>. Sugere-se que a hiperhomocisteinemia possa exercer algum papel na patogênese da HAP, pois há referência a aumento dos níveis deste aminoácido em pacientes com a doença<sup>34</sup>.

Uma forma particular de disfunção endotelial em pacientes com HAP é aquela associada à hipoxemia, dada a acentuada tendência à trombose. Isto ocorre na assim chamada síndrome de Eisenmenger, onde, em virtude da presença de defeitos intracardíacos com desvio de sangue da direita para a esquerda, desenvolve-se a hipoxemia crônica. Alterações na coagulação e fibrinólise nesses pacientes associam-se a um alto risco de eventos tromboembólicos, havendo relato de até 35% de ocorrência de trombose arterial pulmonar<sup>35</sup>.

Contribui para isto o fato de a hipoxia promover exocitose dos corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais, resultando em liberação do FvW e da selectina-P. Além disso, sabe-se que a hipoxia induz a expressão do RNAm e da proteína do PAI-1, além de suprimir a expressão de trombomodulina. Portanto, na HAP associada à hipoxemia crônica é justificável imaginar que mecanismos como o recrutamento de leucócitos e plaquetas, a inibição da fibrinólise e a perda de controle sobre a coagulação, sejam operantes e contribuam para o evento vaso-oclusivo.

Além de fornecer estimativa do risco trombótico em indivíduos com HAP, os marcadores de disfunção endotelial parecem ter implicações prognósticas. Estudo em pacientes com HAP idiopática e secundária a cardiopatias congênitas correlacionou os níveis elevados do FvW com redução da sobrevida<sup>36</sup>. Pacientes com a forma idiopática da doença apresentaram níveis mais altos, associados a menor expectativa de vida<sup>37</sup>. Outros marcadores bioquímicos também estão sendo estudados, com finalidade prognóstica, como as catecolaminas, o ácido úrico e os peptídeos natriuréticos (ANP e BNP). Apenas o BNP, porém, parece ter correlação com a sobrevida, com níveis elevados em pacientes com HAP idiopática<sup>38</sup>.

## Plaquetas e serotonina

A disfunção endotelial na HAP leva a um estado pró-trombótico, no qual a participação das plaquetas parece inequívoca. Estas têm sido alvo de estudos há vários anos, pois seu papel na HAP é mais que meramente trombogênico, havendo envolvimento também no processo de remodelamento vascular.

Estudos clínicos têm trazido evidências de ativação plaquetária endógena em pacientes com HAP, sugerindo que haja um estado crônico de consumo. Essa sugestão deve-se à observação da redução do número de plaquetas circulantes e níveis elevados de  $\beta$ -tromboglobulina<sup>39</sup>, uma substância liberada na fase de secreção. Sugere-se que esta ativação favoreça a formação de agregados celulares na circulação, envolvendo plaquetas entre si ou em associação com leucócitos e hemácias<sup>40</sup>, o que poderia nos vasos pulmonares, contribuir para a progressão da doença. A ativação plaquetária na HAP também promove a liberação de grânulos densos, contendo agentes mitogênicos e substâncias vasoconstritoras. Uma dessas substâncias é o tromboxane A<sub>2</sub>, potente vasoconstritor cuja produção está elevada em pacientes com HAP<sup>41</sup>. Também são liberados serotonina e fatores de crescimento, como PDGF, EGF e TGF- $\beta$ , com efeito mitogênico em células musculares lisas vasculares, fibroblastos e células endoteliais<sup>42</sup>.

Em diferentes formas de HAP, o envolvimento (ativação) plaquetário tem sido considerado como evento secundário à disfunção endotelial, exposição do subendotélio e alterações das condições de fluxo. Exceção faz-se à situação identificada como doença de estoque das plaquetas (*platelet storage pool disease*), uma entidade rara, familiar, na qual há uma deficiência na capacidade de armazenar serotonina nos grânulos densos, com níveis extremamente elevados dessa substância no plasma, provocando vasoconstrição pulmonar<sup>43</sup>. Com o relato de HAP associada a esta doença<sup>43</sup>, iniciou-se uma série de estudos na tentativa de se demonstrar uma associação causal com a serotonina.

A serotonina é o principal componente dos grânulos densos das plaquetas, sendo liberada a partir de sua ativação. A resposta normal da célula endotelial à serotonina é a liberação de NO,



levando a um relaxamento da musculatura lisa e conseqüente vasodilatação<sup>44</sup>. Porém, em casos de disfunção endotelial, a serotonina tornar-se-ia incapaz de estimular a liberação de NO. Na circulação pulmonar, essa ocorrência favoreceria o desenvolvimento de HAP por mecanismos diversos. A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), exerce sua função através da ligação ao seu receptor 5-HTR, e seu transportador 5-HTT. Ao ligar-se ao 5-HTR, a serotonina ativa a produção de IP<sub>3</sub>, induzindo a liberação de cálcio intracelular do retículo sarcoplasmático, com conseqüente vasoconstrição<sup>45</sup>. Por outro lado, a geração de diacilglicerol está implicada na indução da via mitogênica da proteína-quinase C. A ligação da serotonina ao 5-HTT inicia eventos intracelulares, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio e a ativação da via das MAPP quinases, resultando na expressão de genes envolvidos em hipertrofia e proliferação celular<sup>46</sup>. Vários estudos sugerem que a serotonina tenha um papel na patogênese da HAP, inclusive na forma idiopática. Já foi demonstrada a presença de polimorfismo na região promotora do gene que codifica o 5-HTT, com expressão aumentada do mesmo<sup>19</sup>. Assim, esse gene é hoje considerado como “facilitador” no processo de remodelagem vascular pulmonar.

Uma importante condição clínica, ligada ao metabolismo da serotonina e potencialmente causadora de HAP, é o uso de anorexígenos orais, como a fenfluramina. No sistema nervoso central, o efeito seria exercido por inibição do 5-HTT e, conseqüentemente, da recaptura da serotonina em neurônios. Na periferia, também por interferir com o transportador, a fenfluramina é capaz de impedir a captura da serotonina nas plaquetas e em células endoteliais pulmonares. As conseqüências são o aumento da serotonina livre, de forma semelhante ao que ocorre na *platelet storage pool disease*, e a vasoconstrição pulmonar<sup>19,46</sup>. Nem todos os usuários de anorexígenos orais desenvolvem HAP, sugerindo que distúrbios no metabolismo da serotonina e no funcionamento de seu transportador sejam eventos facilitadores, que necessitam de fatores predisponentes para que a doença se manifeste.

Como citado anteriormente, mutações no gene que codifica o BMPR2 alteram sua sinalização que, em condições normais, suprimiria a proliferação e favoreceria a apoptose de células musculares lisas de artérias pulmonares. Sugere-se que a sinalização a partir do BMPR2 poderia antagonizar os efeitos da serotonina e que mutações nesse receptor permitiriam uma resposta celular exacerbada à mesma, principalmente nos pacientes com polimorfismo do 5-HTT<sup>47</sup>. Essa relação porém é, por enquanto, meramente especulativa.

## Inflamação

A HAP é uma complicação comumente encontrada em várias condições inflamatórias sistêmicas, tais como a esclerodermia e o *lupus eritematosus* sistêmico<sup>48</sup>. Em pacientes com doença do tecido conectivo, as lesões arteriais pulmonares podem ser semelhantes àquelas encontradas em pacientes com HAP idiopática, inclusive a arteriopatia plexiforme. Esse achado impulsionou a busca de um provável mecanismo fisiopatológico comum às duas condições. Foi observado que alguns pacientes com HAP idiopática grave, semelhante às doenças do tecido conectivo, apresentam infiltrado inflamatório em vasos pulmonares, composto por macrófagos e linfócitos T e B<sup>49</sup>. Isto poderia sugerir um papel da inflamação na patogênese ou na progressão da doença.

Além dos achados inflamatórios, vale a pena enfatizar a associação da HAP com doenças ou condições de caráter imune: infecção pelo vírus da imunodeficiência humana<sup>48</sup>, síndrome POEMS (discriasia de célula plasmática com polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína M e alterações de pele)<sup>50</sup>, presença de anticorpos auto-ímmunes<sup>51</sup> e fenômeno de Raynaud<sup>52</sup>. Os principais aspectos imunogenéticos nessas doenças correspondem à presença de auto-anticorpos e de certos alelos do complexo de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe II. De forma semelhante, alguns pacientes com HAP idiopática apresentam níveis elevados de anticorpos antinucleares<sup>51</sup> e uma prevalência de certos alelos presentes em doenças auto-ímmunes. Assim, tem sido observada freqüência aumentada de HLA-DR52 em pacientes com esclerodermia e HAP<sup>53</sup> e de HLA-DR3 e HLA-DR52 em crianças com HAP idiopática<sup>54</sup>. Também já foi demonstrado aumento na freqüência de HLA-DQ7 em crianças e adultos com HAP idiopática, sendo este achado importante, pois o alelo é associado à presença do anticoagulante lúpico em pacientes com *lupus eritematosus* sistêmico<sup>55</sup>.

Na tentativa de identificar mecanismos que levam à condição de inflamação encontrada na HAP, observou-se aumento de vários mediadores. Já foi demonstrado que pacientes com HAP idiopática apresentam níveis séricos elevados de IL-1 e IL-6<sup>56</sup>. Outro achado importante é o envolvimento de quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas capazes de direcionar o recrutamento e a migração de leucócitos. Uma dessas quimiocinas, designada por RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), exerce um poder quimiotático em monócitos e células T. Além disso, a quimiocina RANTES é capaz de induzir a enzima conversora da endotelina-1, resultando em aumento de atividade mitogênica e vasoconstrição<sup>57</sup>. Em pacientes com HAP idiopática, demonstrou-se quantidades aumentadas do RNAm dessa quimiocina em tecido pulmonar, sendo as células endoteliais a principal fonte<sup>58</sup>.

A fractalcina é uma quimiocina que também parece ter papel importante na HAP: promove o recrutamento de leucócitos através do receptor transmembrana CX<sub>3</sub>CR1, com captura de forma rápida e adesão dependente de integrinas. Demonstrou-se em pacientes com HAP elevação dos níveis plasmáticos da fractalcina, aumento do seu RNAm, assim como aumento da expressão e função do receptor CX<sub>3</sub>CR1 em linfócitos<sup>59</sup>.

Outra quimiocina que pode estar envolvida no processo de inflamação da HAP idiopática é MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*), que tem forte poder de quimiotaxia em relação a células mononucleares. É produzida em vários tipos celulares, incluindo monócitos, células endoteliais e musculares lisas. Participa na ativação e migração de monócitos para os sítios de inflamação e também exerce papel na proliferação e desdiferenciação de células musculares lisas. Também é descrito que as citocinas IL-1 e IL-6 podem induzir a expressão de MCP-1 em células musculares lisas e células endoteliais<sup>60</sup>. A concentração sérica de MCP-1 está elevada em pacientes com HAP idiopática, podendo ser um fator relacionado à progressão da doença<sup>61</sup>.

Apesar dos mecanismos inflamatórios estarem estabelecidos em HAP idiopática e associada a doenças do tecido conectivo, ainda há controvérsia sobre seu papel na HAP associada a cardiopatias congênitas. Em relato recente sobre a presença de células inflamatórias em artérias pulmonares periféricas de pacientes com HAP associada a cardiopatias congênitas, foi detectada predominân-

cia de macrófagos jovens nas camadas íntima e média, sugerindo reação inflamatória em curso<sup>62</sup>. Sendo os macrófagos responsáveis pela produção de várias citocinas, especula-se que possam ter participação relevante em eventos mediados por essas substâncias (por exemplo, replicação celular) em pacientes com HAP.

## Hipertensão arterial pulmonar familiar e sua relação com mutação no gene *BMPR2*

Tendo sido apresentada a visão atual acerca dos mecanismos fisiopatológicos mais relevantes que operam na HAP, passamos à apresentação de duas famílias com a doença.

**Família 1** - Nesta família foram identificados quatro casos acometidos de HAP entre 12 membros investigados. Dois pacientes (DED e AKD), conforme indicado no heredograma abaixo (fig. 2), encontram-se em seguimento ambulatorial, estáveis sob tratamento clínico. Em dois outros casos não avaliados em nossa instituição, com evolução para óbito, o diagnóstico foi presuntivo, baseado em relatos de familiares.

O estudo genético foi realizado em cinco indivíduos desta família, conforme demonstrado no heredograma. O estudo consistiu na amplificação, pela reação da polimerase em cadeia (PCR), dos 13 exons do gene que codifica o receptor *BMPR2*. O produto da reação foi então submetido a sequenciamento por método automatizado. Conforme demonstrado na figura 3, identificou-se mutação pontual no exon 9 nos pacientes DED e AKD, mas não nos familiares saudáveis. A mutação, correspondente à substituição de um nucleotídeo, encontra-se ilustrada no cromatograma.

O paciente DED, 15 anos de idade, encontrava-se em classe funcional IV na admissão, com pressão média na pulmonar de 62 mmHg, impossibilitado de percorrer qualquer distância no teste de 6 minutos de caminhada. Após início de tratamento com sildenafil por via oral, na dose de 225 mg ao dia, observou-se melhora importante na capacidade física, passando a caminhar 399 m e 471 m, respectivamente, aos 6 meses e 1 ano. Observou-se também incremento do fluxo pulmonar, estimado através do ecocardiograma, de 50% em 6 meses e 38% em 1 ano. Sua irmã (AKD), 18 anos de idade na admissão, teve manifestações (cansaço) de menor intensidade e início mais tardio. Iniciou o tratamento em classe funcional II, com pressão média pulmonar de 50 mmHg e com distância percor-

rida de 309 m no teste de 6 minutos de caminhada. Sob o uso do sildenafil (225 mg/dia), houve aumento na distância percorrida para 504 m aos 6 meses e 1 ano. Também foi observado incremento de 26% no fluxo pulmonar.

**Família 2** - Nesta família, entre 40 membros investigados através de informações prestadas, foram identificados seis indivíduos potencialmente acometidos de HAP. Destes, o diagnóstico de certeza foi estabelecido somente para o paciente EMB e dois de seis irmãos, falecidos aos 11 e 14 anos, conforme indicado no heredograma (figura 4). A pesquisa de mutações no gene *BMPR2* resultou negativa nesta família.

O paciente EMB, 33 anos de idade, encontrava-se em classe funcional IV na admissão, chegando a fazer uso de drogas vasoativas. A presença de estertores pulmonares, com desaparecimento mediante terapêutica diurética, fez suspeitar de doença venooclusiva, diagnóstico posteriormente confirmado por estudo hemodinâmico e biópsia pulmonar.

A avaliação deste paciente incluiu o teste agudo de vasodilatação com óxido nítrico (10 ppm) e sildenafil (75 mg por via oral). O teste demonstrou vasodilatação pulmonar significativa com ambos os estímulos aplicados separadamente, havendo queda expressiva da resistência vascular (de 27,9 unidades Wood/m<sup>2</sup>, em condição basal, para 8,3 e 11,1 U/m<sup>2</sup>, respectivamente, com óxido nítrico e sildenafil). Entretanto, a pressão média capilar pulmonar estabilizou-se em nível mais seguro com sildenafil, comparado ao óxido nítrico, com valores de 15 e 29 mmHg, respectivamente. Os resultados deste estudo permitiram a orientação do uso crônico do sildenafil (225 mg/dia) associado a diuréticos, com melhora clínica evidente após um ano, sendo possível retirar o paciente da fila de espera para o transplante pulmonar. A distância percorrida no teste de caminhada passou de 112 m, na condição pré-tratamento, para 294 m e 408 m, em 6 meses e 1 ano, respectivamente. O ecocardiograma também mostrou incremento do fluxo pulmonar de 50% e 120%.

Estas observações ressaltam alguns aspectos importantes da HAP. Em primeiro lugar, o diagnóstico da forma familiar, que na prática clínica possibilitaria a identificação da doença em estágios menos avançados, em indivíduos com sintomatologia discreta ou ausente. Em segundo lugar, a importância das mutações no gene *BMPR2* no cenário fisiopatológico, com a possibilidade de se identificar tais alterações gênicas em pelo menos 50% das famílias acometidas. Por último, o papel fisiopatológico do óxido nítrico e das vias a ele relacionadas, como justificativa para a aplicação racional de recursos terapêuticos com capacidade de aumentar os níveis intracelulares de GMP cíclico em arteríolas pulmonares.

## Considerações finais

Em vista dos mecanismos discutidos, fica claro que a HAP é uma síndrome cujo início e progressão se processa de maneira diversa, dependendo do caso. Não é possível imaginar o mesmo mecanismo ou conjunto de mecanismos fisiopatológicos explicando a vasoconstrição e a evolução da remodelagem vascular em todas as formas de HAP. Além disso, mesmo se considerarmos uma única forma da doença, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos podem variar de acordo com a fase evolutiva. Assim, percebe-se as dificuldades no desenvolvimento de recursos terapêuticos utilizáveis em humanos, uma vez que isso dependeria da clara definição dos mecanismos

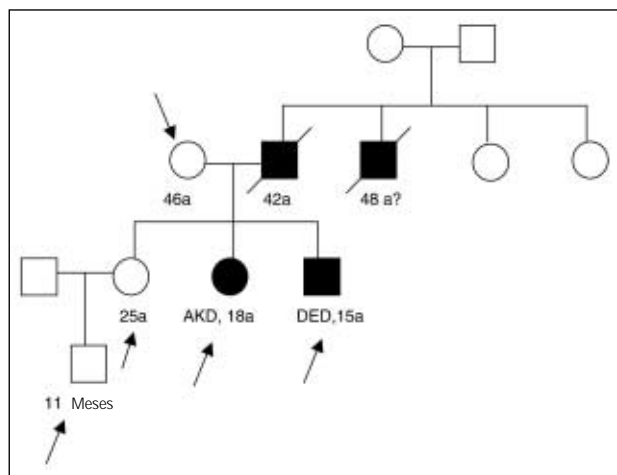


Fig. 2 - Heredograma da família 1, mostrando os membros acometidos de HAP. As setas indicam os indivíduos nos quais o estudo genético foi realizado.

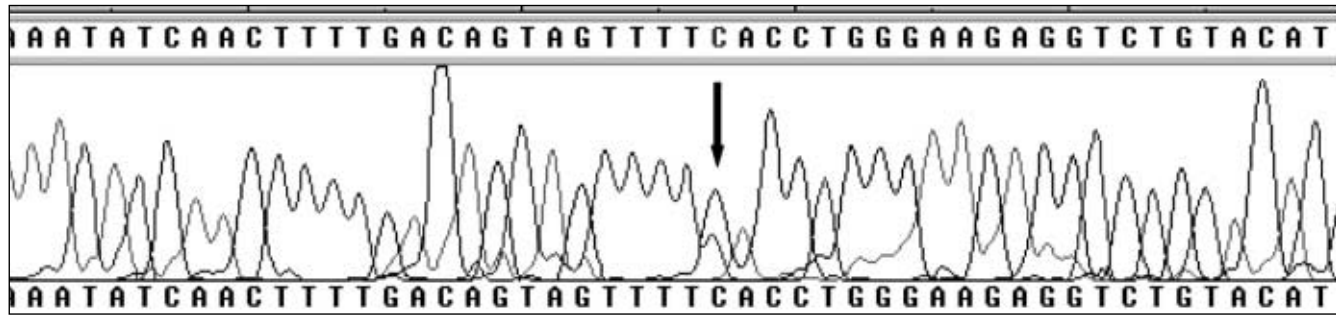


Fig. 3 - Representação esquemática de mutação identificada em dois membros da família 1, com respeito ao gene que codifica o receptor BMPR2. Observou-se a substituição de um nucleotídeo no exon 9. No cromatograma, a seta indica a presença de dois alelos, o normal e o patológico, caracterizando uma situação de heterozigose nos pacientes.

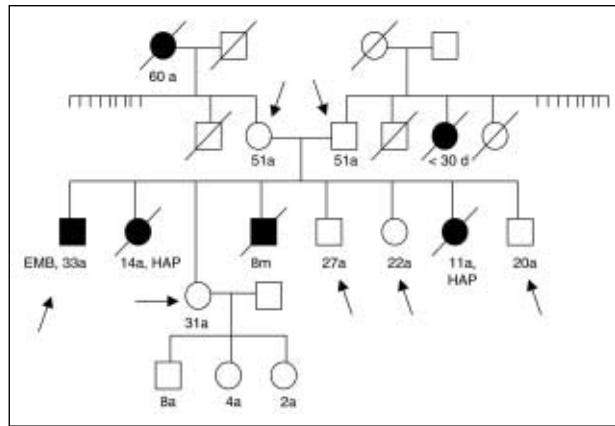


Fig. 4 - Heredograma da família 2, indicando os indivíduos com diagnóstico de certeza de HAP (EMB e irmãos de 11 e 14 anos), assim como outros membros com provável acometimento. Identificados pela setas estão os indivíduos nos quais o estudo genético foi realizado.

## Abreviações

AML-1, leucemia mielógena aguda-1; AMP, monofosfato de adenina; ANP, peptídeo atrial natriurético; Apo A-1, apolipoproteína A1; BMP, proteína morfogenética óssea; BMPR2, receptor 2 do BMP; BNP, peptídeo cerebral natriurético; EGF, fator de crescimento epidérmico; ERO, espécies reativas de oxigênio; ERK, quinase com regulação extracelular; ET-1, endotelina-1; EVE, elastase vascular endógena; FGF-2, fator de crescimento de fibroblastos; FvW, fator de von Willebrand; GMP, monofosfato de guanina; HAP, hipertensão arterial pulmonar; HIF-1, fator induzível por hipóxia; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; 5-HTR, receptor da 5-hidroxitriptamina; 5-HTT, transportador da 5-hidroxitriptamina; IGF-1, fator de crescimento insulina-símile; IL-1, interleucina-1; IL-6, interleucina-6; Kv, canal de potássio dependente de voltagem; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos; MHC, complexo de histocompatibilidade principal; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; PKC, proteína-quinase C; POEMS (síndrome), discrasia de célula plasmática, polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína M e alterações de pele; TGF- $\beta$ , fator de crescimento transformador do tipo beta; TN-C, tenascina-C; t-PA, ativador tecidual do plasminogênio; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR, receptor do fator de crescimento endotelial vascular.

operantes em um caso particular ou ainda da identificação de alterações comuns a vários pacientes com diferentes formas da doença. Mesmo assim, as investigações em fisiopatologia da HAP continuam sendo relevantes. Sem elas, aquisições terapêuticas como os prostanoídes, os inibidores de receptores de endotelina e de fosfodiesterases, hoje em uso, não teriam sido possíveis.

## Referências

- Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. Clin Chest Med 2001; 22: 433-449.
- Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 2004; 43: 5S-12S.
- Galie N, Grigioni F, Bacchi-Reggiani L et al. Relation of endothelin-1 to survival in primary pulmonary hypertension. Eur J Clin Invest 1996; 26: 273.
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1925-32.
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 1995; 333: 214-21.
- Archer S, Wu X, Thébaud B et al. Preferential expression and function of voltage-gated, O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Circ Res 2004; 95: 308-18.
- Ward JPT, Snetkov VA, Aaronson PI. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. Cell Calcium 2004; 36: 209-20.
- Mandegar M, Remillard CV, Yuan JXJ. Ion channels in pulmonary arterial hypertension. Prog Cardiovasc Dis 2002; 45: 81-114.
- Yuan X-J, Wang J, Juhaszova M et al. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. Lancet 1998; 351: 726-7.
- Lane KB, Machado RD, Pauculo MW et al. Heterozygous germline mutations in a TGF- $\beta$  receptor, BMPR2, are the cause of familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. Nat Genet 2000; 26: 81-4.
- Atkinson C, Stewart S, Upton PD et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. Circulation 2002; 105: 1672-8.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med 1992; 372: 70-5.
- Hirose S, Hosoda Y, Furuya S et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. Pathol Int 2000; 50: 472-9.
- Gillespie MN, Rippeteo PE, Haven AC et al. Polyamines and epidermal growth factor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Am Rev Respir Dis 1989; 140: 1463-6.
- Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. J Thromb Haemost 2003; 1: 2112-18.
- Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. Am J Physiol 1999; 277: L5-L12.
- Launay JM, Hervé P, Peoc'h K et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. Nat Med 2002; 8: 1129-35.
- Egermayer P, Town GI, Peacock AJ. Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension. Thorax 1999; 54: 161-8.
- Eddahibi S, Humbert M, Fadel E et al. Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension. Chest 2002; 121: 97S-98S.

20. Assender JW, Irenius E, Fredholm BB. Endothelin-1 causes a prolonged protein kinase C activation and acts as a co-mitogen in vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Scand* 1996; 157: 451-60.
21. Weissberg PL, Witchel C, Davenport AD et al. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafatoxin S6c are comitogenic with platelet derived growth factor for vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1990; 83: 257-62.
22. Agui T, Xin X, Cai Y et al. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood* 1994; 84: 2531-8.
23. Peifley KA, Winkless JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 202-08.
24. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H et al. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 74-80.
25. Rabinovitch M. Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114: 213S-224S.
26. Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R et al. Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. *Am J Med* 1996; 101: 160-4.
27. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102: 2720-5.
28. Maeda NY, Lopes AA, Da Rocha TR et al. Plasma anticoagulant system in patients with pulmonary hypertension. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 251-4.
29. Esmon NL, Safa O, Smirnov MD et al. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *J Autoimmun* 2000; 15: 221-5.
30. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanism mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 377-82.
31. Espinosa G, Cervera R, Font J et al. The lung in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 195-8.
32. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 1990; 81: 1735-43.
33. Asherson RA, Higenbottan TW, Dinh Xuan AT et al. Pulmonary hypertension in a lupus clinic: experience with twenty-four patients. *J Rheumatol* 1990; 17: 1292-8.
34. Arroliga AC, Sandur S, Jacobsen D et al. Association between hyperhomocysteinemia and primary pulmonary hypertension. *Respir Med* 2003; 97: 825-9.
35. Caramuru LH, Maeda NY, Bydlowski SD et al. Age-dependent likelihood of *in situ* thrombosis in secondary pulmonary hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004; 10: 217-23.
36. Lopes AA, Maeda NY, Gonçalves RC et al. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000; 139: 618-23.
37. Lopes AA, Maeda NY. Circulating von Willebrand factor antigen as a predictor of short-term prognosis in pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114: 1276-82.
38. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 102: 865-70.
39. Caramuru LH, Soares RPS, Maeda NY et al. Hypoxia and altered platelet behavior influence Von Willebrand factor multimeric composition in secondary pulmonary hypertension. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003; 9: 251-8.
40. Lopes AA, Maeda NY, Almeida A et al. Circulating platelets aggregates indicative of *in vivo* platelet activation in pulmonary hypertension. *Angiology* 1993; 44: 701-06.
41. Christman BW, McPherson CD, Newman JH et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.
42. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* 1994; 90: 1919-26.
43. Herve P, Drouet L, Launay JM et al. Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin. *Am J Med* 1990; 89: 117-20.
44. Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol (Lond)* 1989; 408: 549-60.
45. Boulanger C, Lorenz RR, Hendrickson H et al. Release of different relaxing factors by porcine endothelial cells in culture. *FASEB* 1998; 2: A314.
46. Eddahibi S, Fabre V, Boni C et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle - relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res* 1999; 84: 329-36.
47. Rothman RB, Ayestas MA, Dersch CM et al. Aminorex, fenfluramine and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1999; 100: 869-75.
48. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF et al. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathol* 1997; 28: 434-42.
49. Tuder RM, Groves B, Badesch DB et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144: 275-85.
50. Lesprit P, Godeau B, Authier FJ et al. Pulmonary hypertension in POEMS syndrome: a new feature mediated by cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 907-11.
51. Isern RA, Yaneva M, Weiner E et al. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med* 1992; 93: 307-12.
52. Wigley FM. Raynaud's phenomenon and other features of scleroderma, including pulmonary hypertension. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8: 561-8.
53. Langevitz PD, Buskila D, Gladman DD et al. HLA alleles in systemic sclerosis: association with pulmonary hypertension and outcome. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 609-13.
54. Barst RJ, Flaster ER, Menon A et al. Evidence for the association of unexplained pulmonary hypertension in children with the major histocompatibility complex. *Circulation* 1992; 85: 249-58.
55. Morse JH, Barst RJ, Fotino M et al. Primary pulmonary hypertension, tissue plasminogen activator antibodies, and HLA-DQ7. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 274-8.
56. Humbert M, Monti G, Breno TF et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1628-31.
57. Molet S, Furukawa K, Maghazechi A et al. Chemokine and cytokine-induced expression of endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 333-8.
58. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselin I et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 534-9.
59. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P et al. CX<sub>3</sub>C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1-8.
60. Sica A, Wang JM, Colotta F et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; 144: 3034-8.
61. Hashimoto K, Nakamura K, Fugio H et al. Epoprostenol therapy decreases elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with primary pulmonary hypertension. *Circ* 2004; 68: 227-31.
62. Pinto RFA, Higuchi ML, Aiello VD. Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13: 268-75.