



# Efecto de dos inhibidores de la fosfodiesterasa 5, sildenafil y vardenafil sobre la arteria pulmonar principal de la rata sometida a condiciones de hipoxia

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 16 de Mayo del 2021 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de dos inhibidores de la PDE-5, sildenafil y vardenafil, sobre la respuesta vasoconstrictora de la NE en condiciones de normoxia e hipoxia. Cuando los anillos fueron pretratados con sildenafil y vardenafil, la contracción de la AP inducida por la NE se disminuyó de una manera dosis-dependiente atenuó en condiciones de normoxia e hipoxia. Solo el sildenafil modificó la curva dosis-respuesta a la NE, potenciando su efecto (DE50 normoxia=  $1 \times 10^{-5}$  M; DE50 hipoxia=  $6,4 \times 10^{-4}$  M,  $p < 0,05$ ). Con vardenafil los

valores de DE50 fueron  $1 \times 10^{-4}$  M en normoxia y  $6.4 \times 10^{-5}$  M en hipoxia ( $p > 0.05$ ). En conclusión, la hipoxia potencia la acción del sildenafil, posiblemente debido a un mayor aumento de la recaptación de calcio, asociado a un incremento de la vía del ON/GMPc. El vardenafil, aunque produce una relajación significativa tanto en normoxia como en hipoxia, no alteraría esta vía del calcio.

**PALABRAS CLAVE:** arteria pulmonar, hipoxia, sildenafil, vardenafil, GMPc

#### **EFFECT OF TWO PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITORS, SILDENAFIL AND VARDENAFIL ON THE MAIN PULMONARY ARTERY OF THE RAT SUBJECTED TO HYPOXIC CONDITIONS**

#### **SUMMARY**

The aim of this study was to compare the effect of two PDE-5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on the vasoconstrictor response of NE under conditions of normoxia and hypoxia. When rings were pretreated with sildenafil and vardenafil, NE-induced PA contraction was decreased in a dose-dependent manner attenuated under conditions of normoxia and hypoxia. Only sildenafil modified the dose-response curve to NE, potentiating its effect (DE50 normoxia=  $1 \times 10^{-5}$  M; DE50 hypoxia=  $6.4 \times 10^{-4}$  M,  $p < 0.05$ ). With vardenafil DE50 values were  $1 \times 10^{-4}$  M in normoxia and  $6.4 \times 10^{-5}$  M in hypoxia ( $p > 0.05$ ). In conclusion, hypoxia potentiates the action of sildenafil, possibly due to a greater increase in calcium reuptake, associated with an increase in the ON/GMPc pathway. Vardenafil, although producing significant relaxation in both normoxia and hypoxia, would not alter this calcium pathway.

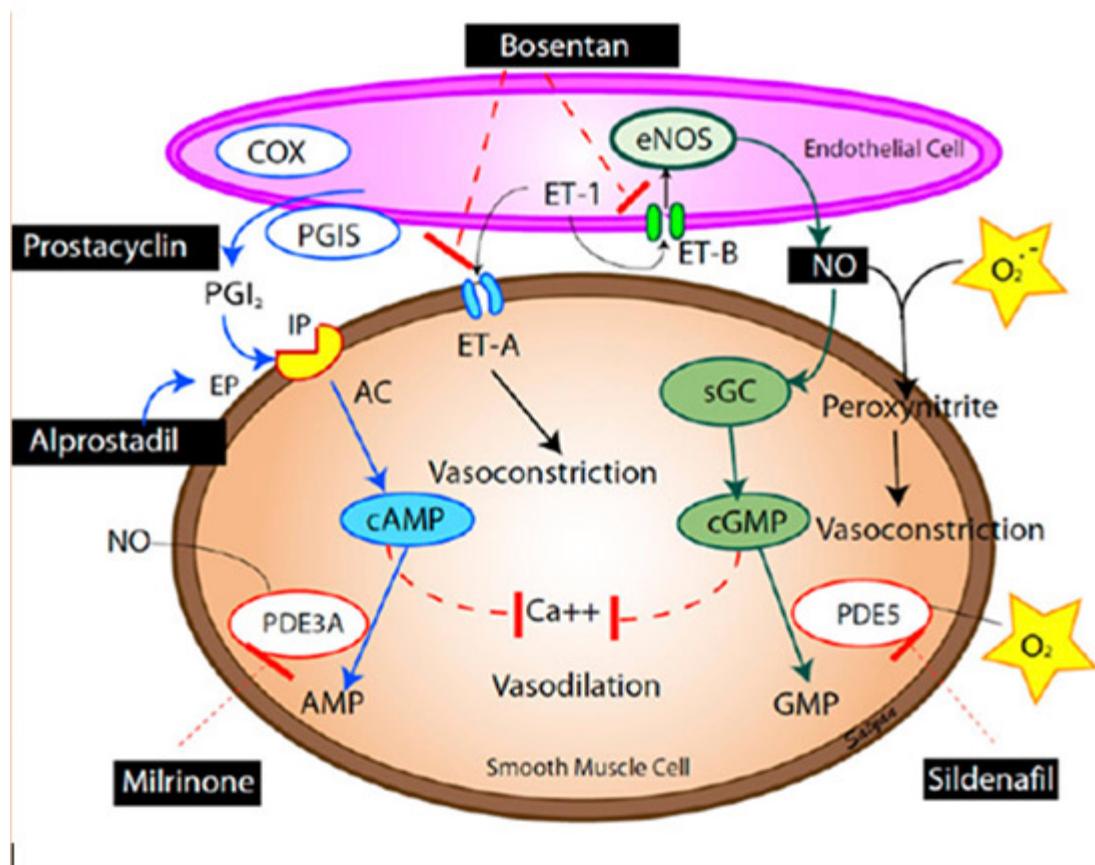
**KEY WORDS:** pulmonary artery, hypoxia, sildenafil, vardenafil, GMPc

#### **EFECTO DE DOS INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA 5, SILDENAFIL Y VARDENAFIL SOBRE LA ARTERIA PULMONAR PRINCIPAL DE LA RATA SOMETIDA A CONDICIONES DE HIPOXIA**

#### **INTRODUCCIÓN**

Los nucleótidos cílicos intracelulares (AMPc y GMPc) están implicados en el control del tono del músculo liso vascular incluyendo la arteria pulmonar<sup>(1)</sup>. Aquellos agentes que incrementan los niveles intracelulares de AMPc o de GMPc relajan los anillos de arteria pulmonar previamente contraídos con agonistas<sup>(2, 3)</sup>. Asimismo, el Óxido nítrico (ON) liberado por las células endoteliales induce un incremento en la concentración intracelular de GMPc y una relajación de la arteria pulmonar. En las células del músculo liso vascular la concentración del GMPc es dependiente principalmente de un equilibrio entre la producción de guanilciclasa (GC) y su degradación por la fosfodiesterasa (PDE), que representa la única vía de degradación de este segundo mensajero intracelular<sup>(4, 5, 23, 47)</sup>. Como consecuencia de esto, la PDE está también implicada en el control del tono del músculo liso vascular. (Figura 1). En la arteria pulmonar de ratas y humanos, se han identificado cuatro tipos de PDE (PDE 1, 3, 4 y 5)<sup>(6, 7)</sup>. Es por esto que la modulación de la actividad de las mismas, utilizando inhibidores selectivos puede ser un medio efectivo para controlar el tono de la vasculatura pulmonar. La isoforma PDE-5 se expresa abundantemente en el lecho vascular pulmonar, lo que ha generado interés en el uso de inhibidores de la PDE-5 para la hipertensión pulmonar y otras patologías

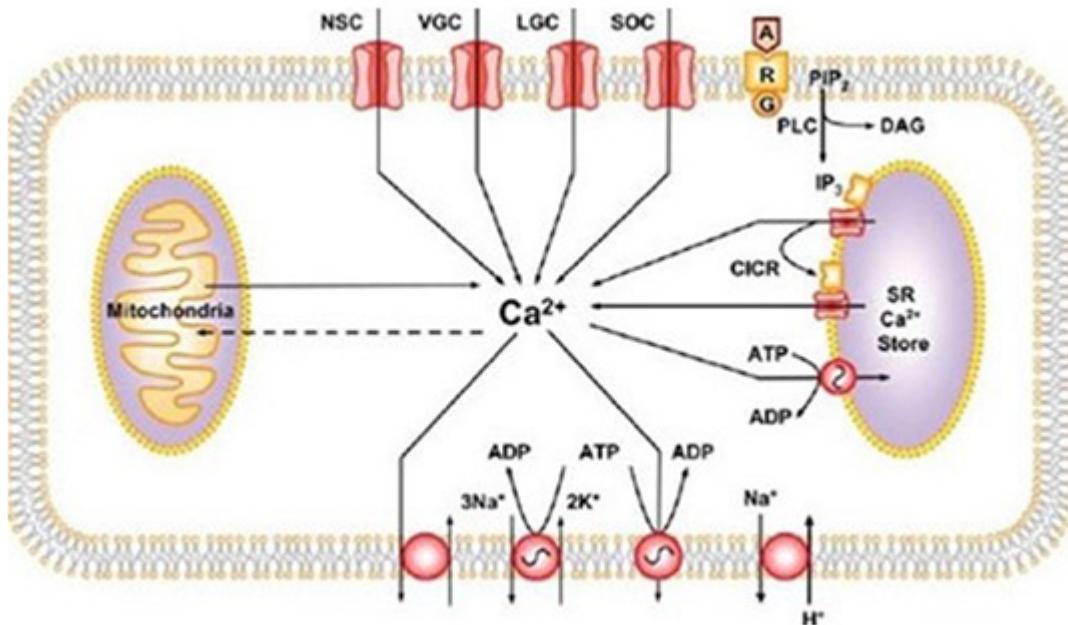
vasculares [7]. La circulación pulmonar desarrolla una respuesta específica a la hipoxia, por ejemplo, vasoconstricción, que puede ser mantenida en pacientes que presentan enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, entre otras (8, 9), lo que a su vez induce una elevación sostenida en la presión arterial pulmonar. Esta hipertensión arterial pulmonar (HP) conduce a hipertrofia ventricular derecha, insuficiencia cardíaca derecha y muerte (10). Se ha observado en la circulación pulmonar que: 1) el GMPc cumple un papel importante en la resistencia vascular pulmonar (11); 2) La PDE5, es la enzima que hidroliza específicamente al GMPc (12) y se expresa abundantemente en pulmón completo, predominando en las células musculares lisas pulmonares (13); 3) tanto la actividad como la expresión de la PDE5 se incrementan en arteria pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar (14, 25) y existe una correlación directa entre la actividad de la PDE5 y la resistencia vascular pulmonar (15, 48). Actualmente se la propuesto el uso del citrato de sildenafilo y el vardenafilo, potentes inhibidores selectivos de la PDE5, de uso común para el tratamiento de la disfunción eréctil para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, tanto en animales como en humanos (16, 17, 18, 19). Asimismo el sildenafilo ha probado ser útil en hipoxia en las altitudes al mejorar la hipertensión pulmonar y edema intersticial asociado a ella con la consiguiente mejora en la relación ventilación perfusión (20, 49). Sin embargo, poca información se conoce con respecto a los mecanismos moleculares relacionados con las vías de señalización en las células del músculo liso vascular y la hipoxia (46), aunque el efecto relajante de los IPDE-5 se relaciona con el GMPc, que produce la relajación vascular a través de la activación de las proteíncinasas dependientes del GMPc, lo que conduce a una disminución del calcio intracelular.



**Figura 1.** Mediadores derivados del endotelio: la vasodilatadores prostaciclina ( $PGI_2$ ) y el óxido nítrico (NO) [vasodilatadores] y la endotelina (ET-1) [vasoconstrictora]. La ciclooxygenasa (COX) y la prostaciclina sintasa (PGIS) están involucrados en la producción de prostaciclina. La prostaciclina actúa sobre su receptor (IP) en la célula del músculo liso y estimula la adenilciclase (AC) para producir monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). El AMPc se descompone por la fosfodiesterasa 3A (PDE3A). La milrinona inhibe la PDE3A y aumenta los niveles de AMPc en las células del músculo liso arterial y cardiomiositos. Actúa sobre los receptores de endotelina ET-A que causan la vasoconstricción. Un segundo receptor de endotelina (ET-B) estimula la liberación de NO y la vasodilatación en la célula endotelial. La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) produce NO, lo cual estimula la enzima guanilciclase soluble (sGC) para producir monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). El GMPc es degradado por la enzima PDE5. El sildenafil inhibe la PDE5 y aumenta los niveles de cGMP en las células del músculo liso arterial pulmonar. El AMPc y GMPc reducen las concentraciones de calcio citosólicas e inducen en las células de músculo liso vascular, la relajación y vasodilatación pulmonar. El NO es un radical libre y se puede combinar con avidez con aniones superóxido para formar el peroxinitrito vasoconstrictor tóxico. Los medicamentos utilizados en la hipertensión pulmonar persistente se muestran en cajas negras. [Tomado De Golombok, S; Sola, A; Lemus, L. y col. Recomendaciones del VI Consenso Clínico de SIBEN para la Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido. NeoReviews 2017; 2017; 18: e327-344 (49)]

En la figura 2 se muestra un esquema que relaciona los diferentes canales únicos que contribuyen con la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora en el músculo liso vascular (21).

Es de importancia el papel determinante del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta a la hipoxia, modulando este a su vez la acción de algunos canales de  $\text{K}^+$ , como es el caso de los canales de potasio dependientes de voltaje (KV). Es importante destacar que existe una respuesta diferencial a la hipoxia, especie y dependiente del lecho vascular. En resultados anteriores mostramos una inhibición de la respuesta contráctil en hipoxia en la arteria pulmonar principal de la rata, pero un incremento de la misma en la misma preparación de cobayo.



**Figura 2.** Representación esquemática de los mecanismos de homeostasis y movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso vascular. El calcio almacenado en el retáculo sarcoplasmico (RS) es liberado en respuesta al trifosfato de inositol (IP3) o al  $\text{Ca}^{2+}$  vía mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular entra a la célula a través de un canal no específico para este ión (NSC), operado por receptor o por ligando (LGC), por los canales de calcio tipo L, voltaje dependientes (VGC) y los canales operados por almacenamiento (SOC). El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es tomado por la CaATPasa del RS o sacada por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del plasmalema. Cuando se encuentran altas concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la mitocondria contribuyen con la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . A:Agonista, R:receptor, G:proteína unidora de guanosín trifosfato, PIP2: bifosfato de inositol, PLC: fosfolipasa C. (Tomado de Regulation of Vascular Smooth Muscle Function Raouf A. Khalil 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. <http://www.fishpond.com.au/Books/RegulationofVascularSmoothMusclefunctionColloquiumSeriesonIntegratedSystemsPhysiologyRaoufKhalil-DNeilGrangerSerieseditedby9781615041800> [21])

En estudios más recientes se ha involucrado a los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 en producir una mayor angiogénesis en aquellas situaciones clínicas cardiovasculares que cursen con isquemia, por lo tanto podría ser un excelente blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad isquémica cardíaca y enfermedad arterial periférica (44, 45)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Utilizamos ratas hembras SpragueDawley provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela (Caracas), con un peso de  $295 \pm 34$  g las cuales se mantuvieron con comida (Ratarina®) y agua a voluntad. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con tiopental sódico (Nesdonal®, Specia, RhonePoulencRorer, París)(50mg/Kg de peso del animal). Se les realizó una toracotomía media donde se expuso el corazón y la arteria pulmonar principal que se cortó en anillos (34mm de longitud) y se retiró el tejido conectivo. Estos fueron colocados en una cápsula de Petri con solución de Kreb'sHenseleit (en mM/litro): NaCl, 119; KCl, 4,7; MgSO4, 1,5; KH2PO4, 1,2; NaHCO3, 25; CaCl2, 2,5; MgSO4, 1,2 y glucosa, 11, burbujeada constantemente con 95% O2, 5% CO2 a 37°C, pH=7, en normoxia y 95% N2, 5% CO2 en hipoxia. Los anillos se montaron en dos estribos de acero inoxidable en un baño para órgano aislado (20 ml). Uno de los estribos se unió al fondo del baño y el otro a un transductor de fuerza desplazamiento FTO3, (Grass Instruments C.O. Quince, Mass. USA) y este, a su vez, a un preamplificador Grass modelo 7C a una velocidad de 2,5 mm/min. A cada anillo, se le aplicó una tensión basal de dos gramos (la cual fue escogida en experimentos preliminares). Se estabilizó cada segmento de arteria por dos horas, para luego inducir una primera contracción con solución despolarizante (esta contiene 40 mEq de KCl que sustituirá una cantidad equivalente de NaCl). Para determinar la integridad funcional del endotelio en las preparaciones, se añadió acetilcolina a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M a la arteria pulmonar principal contraída con NE ( $1 \times 10^{-6}$  M) según el método de Furchgott y Zawadzki (22). Todos los anillos se utilizaron una sola vez. Posterior a dos horas de estabilización de la arteria pulmonar, se procedió a estimularse con NE ( $1 \times 10^{-6}$  M) en una solución Krebs-Henseleit hasta alcanzar la fase de meseta de la contracción; la amplitud de esta será utilizada como referencia. El sildenafil se añadió en concentraciones crecientes de una manera acumulativa en un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{-7}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M. Luego, se lavó la preparación y se repitió el procedimiento luego de treinta minutos de hipoxia. Con vardenafil, se utilizó ( $1 \times 10^{-6}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar ( $X \pm EEM$ ). La significancia estadística se determinó por la prueba no pareada de *t*-student para dos grupos de comparación con corrección de Welch's con una significancia de  $p < 0,05$ . Una regresión no lineal simple, se realizó en cada curva de dosis respuesta, donde se obtuvo la DE50. Esta se expresó como el log de la concentración molar del agonista, siendo calculada mediante el programa Graph Pad Sofware®, versión 6.01. Se utilizaron las siguientes drogas: L-arterenol (norepinefrina) y acetilcolina obtenidas de Sigma Chemical Co, St. Louis, SA. El sildenafil fue obtenido por Pfizer, Inc., y vardenafil (Levitra, tabletas de 10 mg de vardenafil) fueron preparadas de la presentación comercial. El vardenafil se disolvió en dimetilsulfóxido, el resto en agua deionizada. La NE se preparó como una solución stock ( $1 \times 10^{-3}$  M) que se disolvió en ácido ascórbico al 1% para prevenir su oxidación y se almacenó a 4°C. Las diluciones respectivas fueron realizadas en la solución de Kreb's-Henseleit.

## RESULTADOS

Como se muestra en la figura 3, en condiciones de normoxia comienza a relajarse los anillos de arteria pulmonar de rata a una concentración de sildenafile de  $1 \times 107$  M, alcanzándose la relajación total (100%) a una concentración de  $3 \times 104$  M, con una DE50 de  $1 \times 105$  M. En condiciones de hipoxia, se desplazó la curva de dosis-respuesta hacia la izquierda 2,5 veces con un valor de DE50 de  $4 \times 106$  M (p

## DISCUSIÓN

Se han sintetizado varios compuestos que inhiben potentemente la PDE5 que se utilizan clínicamente para el tratamiento de la disfunción eréctil masculina y la hipertensión pulmonar entre otras enfermedades pulmonares (6, 36). El sildenafile fue el primer compuesto de esta clase que se comercializó para el tratamiento de esta entidad clínica. Los nuevos inhibidores de la PDE5 que tienen el mismo mecanismo terapéutico que el sildenafile, como el tadalafilo y el vardenafilo también han sido aprobados para su uso en muchos países. Las estructuras del tadalafilo y el vardenafilo difieren significativamente de la del sildenafile y estos tres compuestos tienen potencias inhibitorias diferentes. En nuestras condiciones experimentales no observamos diferencias significativas en cuanto a la reactividad vascular entre arterias pulmonares de ratas macho, cuando se comparan con las hembras (datos no mostrados), lo que apoya lo reportado por Resta y col. (2001) en el sentido de que no ocurre ninguna disminución en la expresión de la eNOS en la hipertensión pulmonar (24). El presente trabajo demostró que el sildenafile y el vardenafilo disminuyen el tono vascular y relajan los anillos de arteria pulmonar principal de la rata precontraídos con norepinefrina en condiciones de normoxia e hipoxia. Dicho efecto relajante está principalmente relacionado con la acción inhibitoria de estos agentes sobre las vías de señalización de calcio. Debido a que la respuesta inducida por agonistas actúa mediante la activación de receptores acoplados a la proteína G, la acción del sildenafile y vardenafilo podría estar relacionada con una disminución de la entrada de calcio del plasmalema, un incremento en su salida o una mayor recaptación por los sitios de almacenamiento intracelular de calcio. En anillos de arteria pulmonar principal de la rata pretratados con agonistas (norepinefrina) los valores obtenidos de DE50 para el sildenafile y vardenafilo muestran una mayor potencia para el primero. Esto contrasta a lo encontrado por Blount y col. (2004)(26) quienes demostraron una mayor potencia del vardenafilo con respecto al sildenafile asociada con una menor tasa de disociación de la PDE5. Podríamos explicar estas diferencias por el hecho que existiría una selectividad mayor del sildenafile en el lecho vascular pulmonar. Es importante destacar que en la arteria pulmonar principal de la rata en condiciones de hipoxia se observa el efecto vasodilatador a menores concentraciones del sildenafile, cuando se compara en condiciones de normoxia. Esta potenciación del efecto podría ser explicada porque en aquellas situaciones donde se disminuya la presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ), el sildenafile podría inhibir la entrada de calcio por el plasmalema o probablemente favorezca una mayor recaptación por los sistemas de recaptación intracelular de este ion como es el caso del retículo sarcoplásmico. Asimismo, Texeira y col. 2006 (27) no observaron este mecanismo en aorta de rata. Esto favorece la teoría que existe una mayor selectividad y afinidad de estos agentes por la vasculatura pulmonar, cuando se compara con la sistémica. Resultados diferentes a los nuestros fueron encontrados por Pauvert y col. 2004 (28) quienes observaron en anillos de arteria pulmonar de rata que la

hipoxia desplazaba la curva de dosisrespuesta al sildenafil (0,1 nM a 1 uM) hacia la derecha. Estas diferencias encontradas podrían deberse al hecho que midieron el efecto de la hipoxia crónica de 21 días y en estas condiciones podría incrementarse la expresión de la PDE5 relacionada por sí misma con el efecto de la hipoxia. El desplazamiento hacia la izquierda de la curva de dosisrespuesta al sildenafil en condiciones de hipoxia en nuestras condiciones experimentales podría relacionarse además con que durante la hipoxia se activaría un canal de K<sup>+</sup> sensible al Ca<sup>+2</sup> pudiendo además incrementarse la sensibilidad de la maquinaria contráctil al mismo, que estaría asociado a la vía de las RhoRho cinasas. Este argumento difiere al ofrecido por Nagaoka y col. (29) quienes sugirieron que esta vía puede ser un medio importante para incrementar el tono y la reactividad a agonistas durante la HTP. La razón de estas discrepancias para el mismo modelo animal no es evidente. Es interesante especular con respecto al papel y la organización espacial de las diferentes vías biosintéticas en el árbol vascular pulmonar. Diferentes segmentos de la vasculatura pulmonar varían en su respuesta a factores vasoactivos, siendo probablemente más importante la acción de los péptidos vasoactivos en regular el tono vascular en la hipertensión pulmonar, mientras que la vía derivada del eNOSON sería la utilizada para mantener la estructura normal de la vasculatura pulmonar distal (30). El hecho de no producirse ninguna modificación en la respuesta vasodilatadora al utilizar vardenafil, podría ser explicada por el hecho que este agente, aunque es un potente vasodilatador, no contribuye a un mayor almacenamiento intracelular de calcio en condiciones de hipoxia(42). Los inhibidores de la PDE5 incrementan la vía NO/GMPc ya que disminuyen su respuesta luego de la remoción endotelial. Este hallazgo corrobora trabajos anteriores que reportan una relajación vascular mediada por inhibidores de la PDE5 en aorta de rata (31, 33) y arteria intrapulmonar de rata (34). Pauvert y col, 2000 (35) sugirieron que los efectos del sildenafil y sus relación con la vía de señalización de Ca<sup>+2</sup>es muy similar al observado con la 8- bromoguanosina, 3'5' monofosfato cíclico y el ON de la misma preparación, lo que les sugirió que el efecto del sildenafil es mediado vía GMPc. Esta hipótesis se refuerza por el hecho que: i) el sildenafil es un potente inhibidor de la PDE5 purificada (CI50= 3,4 nM) en células musculares lisas pulmonares(36), ii) Isoenzimas de la PDE5 son expresadas en arteria pulmonar de rata (37, 38, 43), y iii) el sildenafil incrementa los niveles séricos de GMPc y disminuye la resistencia vascular pulmonar en humanos con hipertensión pulmonar (32, 39). Entre las alteraciones propuestas que producen el sildenadil y el vardenafil en las vías de señalización de calcio relacionadas con el GMPc encontramos una fosforilación del receptor de IP3 (RIP3) y una inhibición de la PLC, lo que disminuiría la formación intracelular de IP3 y la activación de la SERCA(40). Este último mecanismo podría estar incrementado durante la hipoxia en presencia de sildenafil y pudiera explicar nuestros resultados. La vía de señalización NO cGMP es compensatoriamente regulada hacia arriba en el modelo de HP de ratón y el sildenafil aumenta esta vía para mejorar funcionalmente la vasoconstricción pulmonar(41). En conclusión, la respuesta vasodilatadora en hipoxia se potenció con el sildenafil, asociado este mecanismo con un incremento en los niveles de GMPc como consecuencia de la inhibición de la PDE5. Posiblemente el sildenafil contribuya en hipoxia a un mayor incremento de la recaptación de calcio, asociado con un incremento independiente en la vía del ON/GMPc. El vardenafil, aunque produce una relajación importante tanto en normoxia como en hipoxia, no induciría un mayor almacenamiento de calcio durante estas condiciones, posiblemente se requieran mayores concentraciones del fármaco para poder ser observado este efecto potenciador.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Carvajal , J; Germain, A; Huidobro-Toro, J and keiner, C. Molecular mechanism of cGMP- mediatedsmoothmusclerelaxation. *J. Cell. Physiol.* 184: 409-420. 2000
- 2. Priest R, Hucks D, and Ward JPT. Potentiation of cyclic AMP-mediated vasorelaxation by phenylephrine in pulmonary arteries of the rat. *Br J Pharmacol* 127: 291-299, 1997.
- 3. Ghofrani, B. Tsai, H. Wang, Mark W. Turrentine, Y. Mahomed, John W. Brown, y col, Hypoxic pulmonary vasoconstriction in cardiothoracic surgery: basic mechanisms to potential therapies. *Ann ThoracSurg.* 78:360-368. 2004
- 4. Pauvert O, Marthan R, and Savineau JP. NO-induced modulation of calcium- oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 27: 329-338, 2000
- 5. Polson J and Strada S.Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 403-427, 1996
- 6. Pauvert O, Savail D, Rousseau E, Lugnier C, Marthan R, and Savineau J. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. *Biochem Pharmacol* 63: 1763-1772, 2002
- 7. Rabe K, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, and Magnussen H. Identification of PDE isoenzymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol* 266: L536-L543, 1994
- 8. Marthan R, Castaing Y, Manier G, and Guenard H. Gas exchange alterations in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest* 87: 470-475, 1985.
- 9. Pierson DJ. Pathophysiology and clinical effects of chronic hypoxia. *Respir Care* 45: 39-51, 2000
- 10. Dawson CA. Role of pulmonary vasomotion in physiology of the lung. *Physiol Rev* 64: 544-616, 1984.
- 11. Hanson K, Burns F, Rybalkin S, Miller J, Beavo J, and Clarke W. Developmental changes in lung cGMP phosphodiesterase-5 activity, protein, and message. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 279-288, 1998.
- 12. Stoclet J, Keravis T, Komas N, and Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *ExpOpin Invest Drugs* 4: 1081-100, 1995
- 13. Michelakis E, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, y col, Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 108: 2066-2069, 2003.
- 14. Murray F, MacLean M, and Pyne N. Increased expression on the cGMP-inhibited cAMP- specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 137: 1187-1194, 2002.
- 15. Hanson K, Ziegler J, Rybalkin S, Miller J, Abman S, and Clarke W. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMPphosphodiesterase activity. *Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol* 275: L931-L941, 1998.
- 16. Chinose F, Erana-Garcia J, Hromi J, Raveh Y, Jones R, Krim L, y col, Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 29: 1000-1005, 2001
- 17. Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, and Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary

- arterial hypertension. Comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105: 2398-2403, 2002.
- 18. Sebkhi A, Strange J, Phillips S, Wharton J, and Wilkins M. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 107: 3230-3235, 2003.
  - 19. Wilkins, M; Wharton, J; Grimminger, F. and Ghofrani, H. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 32: 198-209. 2008
  - 20. Lalande S, Snyder E, Olson T, Hulsebus M, Orban M, Somers V, Johnson B and Frantz R. The effects of sildenafil and acetazolamide on breathing efficiency and ventilatory control during hypoxic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 106(4):509-515. 2009
  - 21. Khalil 2010. Regulation of Vascular Smooth Muscle Function. Raouf A. Khalil 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. [En línea] <http://www.fishpond.com.au/Books/RegulationofVascularSmoothMuscleFunctionColloquiumSerieson-IntegratedSystemsPhysiologyRaoufKhalilDNeilGrangerSerieseditedby/9781615041800> [Consulta: 30 de Agosto de 2013]
  - 22. Furchtgott, R and Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376. 1980.
  - 23. Ghofrani, H; Voswinckel, R; Reichenberger, F; Olschewski, H; Haredza, P y col. Differences in hemodynamic and oxygenation response to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.* 2004. 44(7): 1488-1496
  - 24. Resta, T; Kanagy, N. and Walker, B. Estradiol-induced attenuation of pulmonary hypertension is not associated with altered eNOS expression. *Am. J. Physiol.* 280: L88-L97, 2001
  - 25. Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH and Corbin JD (2004) Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol* 66:144-152.
  - 26. Cleber E, Teixeira, Fernanda B. M. Priviero, and R. Clinton Webb. Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta. *JPET* 316:654-661, 2006
  - 27. Teixeira, C. Priviero, F. and R. Webb, C. Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta. *JPET* 316:654-661, 2006
  - 28. Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, and Savineau J. Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 287: L577-L583. 2004
  - 29. Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I, and Oka M. Rho/Rho-kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol.* 287: L665-L672. 2004
  - 30. Zhao, N. A. Mason, ; N. W. Morrell; B. Kojonazarov, A. Sadykov, A. Maripov, y col, Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 24;104(4):424-8. 2001
  - 31. Mochida H, Inoue H, Takagi M, Noto T, Yano K, and Kikkawa K . Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the

- isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* 440: 45-52. 2002
- 32. Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, and Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. Comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 105: 2398-2403, 2002.
  - 33. Andersen C, Mulvany M, and Simonsen U. Lack of synergistic effect of molsidomine and sildenafil on development of pulmonary hypertension in chronic hypoxic rats. *Eur J Pharmacol* 510: 87-96. 2005
  - 34. Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, and Savineau J. Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 287: L577-L583. 2004
  - 35. Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, and Savineau JP. Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 139: 513-522, 2003
  - 36. Murray F, MacLean MR, and Pyne NJ. Increased expression on the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 137: 1187-1194.
  - 37. Ghofrani H, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9337):895-900
  - 38. Michelakis E, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, y col. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 108: 2066-2069, 2003.
  - 39. Savineau JP, Gonzalez de la Fuente P, and Marthan R. Effect of vascular smooth muscle relaxants on the protein kinase C-mediated contraction in the rat pulmonary artery. *Eur J Pharmacol* 249: 191-198, 1993.
  - 40. Kirsch, M., Kemp-Harper, B., Weissmann, N., Grimminger, F., Schmidt, H. Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. *The FASEB Journal*. 2008;22:30-40
  - 41. Pierson DJ. Pathophysiology and clinical effects of chronic hypoxia. *Respir Care* 45: 39-51, 2000
  - 42. Ghofrani, H; Voswinckel, R; Reichenberger, F; Olschewski, H; Haredza, P y col. Differences in hemodynamic and oxygenation response to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll Cardiol*. 2004. 44(7): 1488-1496
  - 43. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386: 671- 674.
  - 44. Makoto, S., Sata, M., Toshihiro, M., Toshiaki, N., Yasunobu, H. and Ryozo, N. A Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Enhances Angiogenesis Through a Protein Kinase G-Dependent Hypoxia-Inducible Factor-1/Vascular Endothelial Growth Factor Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30:1315-1324.
  - 45. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16: 4604-4613
  - 46. Schlossmann, J. and Schinner, E. cGMP becomes a drug target. *Naunyn-*

Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 385: 243-252. 2012

- 47. Cohen AH, Hanson K, Morris K, et al. Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate- specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. J Clin Invest 1996;97:172-9.
- 48. Tsai, B; Mark W; Turrentine, M, Sheridan y col. ,Differential Effects of Phosphodiesterase- 5 Inhibitors on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Artery Cytokine Expression. Ann Thorac Surg 2006;81:272- 8
- 49. Golombek, S; Sola, A; Lemus, L. y col. Recomendaciones del VI Consenso Clínico de SIBEN para la Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido. NeoReviews. 2017; 18: e327-3440.