



Marcadores biológicos. Utilidad para el control del paciente con hipertensión pulmonar

Julio Sánchez Román*, María Jesús Castillo Palma, Francisco J. García Hernández y Rocío González León

Unidad de Colagenosis e Hipertensión Pulmonar, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

RESUMEN

Palabras clave:

Hipertensión pulmonar
Biomarcadores
NT-proBNP
Genética

Se entiende como marcador biológico cualquier característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como indicadora de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. En el terreno de la hipertensión arterial pulmonar (HAP), además de los marcadores habituales (hemodinámicos y funcionales), se cuenta con un número creciente de biomarcadores que permiten un acercamiento cada vez más completo al conocimiento de la susceptibilidad y al establecimiento del diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento. Estos marcadores pueden ser tanto constitutivos (genéticos) como reactivos a la enfermedad (relacionados con el fallo ventricular derecho, como BMP/NT-proBNP, con la disfunción endotelial, como la endotelina-1, o con la inflamación, como determinadas citocinas y quimiocinas). Los nuevos descubrimientos en genómica y proteómica permiten augurar avances fundamentales en este campo.

© 2011 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Biological markers. Utility in the management of patients with pulmonary hypertension

ABSTRACT

Keywords:

Pulmonary hypertension
Biomarkers
NT-proBNP
Genetics

A biological marker can be defined as any substance that can be objectively measured and evaluated as an indicator of a normal biological process, a pathogenic process or pharmacological responses to a therapeutic intervention. In pulmonary hypertension (PH), in addition to routine markers (hemodynamic and functional), there are a growing number of biomarkers that allow an increasingly comprehensive approach to knowledge of susceptibility to this disease and to diagnosis, prognosis and treatment response. These markers can be both constitutive (genetic) and disease-related (related to right ventricular failure, such as BMP/NT-proBNP, endothelial dysfunction, such as endothelin-1, or inflammation, such as certain cytokines and chemokines). Novel insights in genomics and proteomics may allow major advances in this field.

© 2011 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sanchezroman@telefonica.net (J. Sánchez Román).

Introducción

Los avances terapéuticos en el terreno de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) han modificado sustancialmente la supervivencia de los pacientes afectados. Es por ello importante contar con elementos que permitan discernir su gravedad, el pronóstico y la efectividad de los tratamientos. Los parámetros hemodinámicos y los que miden la capacidad funcional son de gran valor. Los primeros, invasivos, se correlacionan con la gravedad y tienen un importante valor pronóstico mientras que los segundos (correlacionados estrechamente con los anteriores), como la determinación de la clase funcional (CF) y la prueba de la marcha de 6 minutos (PM6M), se utilizan para establecer la situación clínica y la respuesta al tratamiento. Los marcadores biológicos han venido a complementar estas herramientas de diagnóstico-pronóstico. El NIH Biomarkers Definitions Working Group define como marcador biológico (o biomarcador) cualquier característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como indicadora de un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica¹; en otras palabras: toda señal accesible y cuantificable que informa acerca del estado de salud de un sistema biológico². Esta «señal» puede consistir en una molécula circulante, una expresión genética, un marcador celular, una prueba de imagen o un dato de exploración física (instrumental o no). En este análisis obviaremos en parte las dos últimas categorías aunque las utilizaremos como referencia. Además de ser mensurable, un biomarcador debe poseer un grado suficiente de especificidad-sensibilidad, ser susceptible de análisis estadístico y tener un precio razonable. Nos referiremos específicamente a los marcadores útiles en el terreno de la hipertensión pulmonar (HP). La información ofrecida por un marcador puede utilizarse, según Rhodes, desde diferentes puntos de vista²:

1. Susceptibilidad: permiten detectar un mayor riesgo de padecer la enfermedad.
2. Rastreo: hacen posible su detección e intervención precoz en etapas subclínicas.
3. Diagnóstico: posibilitan su reconocimiento en presencia de síntomas característicos.
4. Estadificación: permiten ubicar a un paciente en un grado más o menos avanzado.
5. Monitorización terapéutica: sus modificaciones se correlacionan estrechamente con la respuesta a los tratamientos específicos.

Estos marcadores son de dos categorías: unos, constitutivos, condicionados genéticamente, se emplean para la valoración de la susceptibilidad. El resto podemos considerarlos reactivos a la situación hemodinámica alterada por la enfermedad y serían encuadrables en el resto de los grupos establecidos por Rhodes et al²: en los pacientes con HAP hay una hiperactivación del eje neurohumoral puesto en evidencia por la elevación de la concentración de péptido natriurético cerebral (BPN), proBNP N-terminal (NT-proBNP), catecolaminas y otros³. Se ha podido comprobar una estrecha correlación entre dichas modificaciones y los parámetros hemodinámicos y funcionales de estos pacientes. Los marcadores reactivos traducen, en suma, la presencia de fallo o daño cardíaco, disfunción endotelial o plaquetaria o deterioro del metabolismo oxidativo⁴.

Marcadores genéticos

Como comentamos anteriormente, su utilidad reside fundamentalmente en que constituyen un factor de riesgo de sufrir la enfermedad en un limitado grupo de variantes de HP (exclusivamente las del subgrupo 1.2 [hereditaria] de la clasificación de Dana Point). El primero de estos marcadores descubierto, en 1997, fue el polimorfismo en el gen codificador del receptor tipo 2 de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPR2) que se localiza en el cromosoma 2q31-32. BMPR2

incluye en la superfamilia TGFβ de receptores involucrados en el adecuado crecimiento, diferenciación y reconocimiento celular y en los mecanismos de apoptosis^{2,5} y genera la activación del BMPR-1 mediante su fosforilación. Este, interacciona con segundos mensajeros (proteínas SMADS)^{5,6} que transducen señales al núcleo celular para el control del remodelado y la apoptosis endotelial. La mutación, que neutraliza dichas funciones, aparece en 10-20% de los casos de HAP idiopática (HAPI), en más de 70% de las formas hereditarias y en 9% de los casos asociados a uso de anorexígenos. En el resto de las variantes de HAP no hay una asociación apreciable con BMPR-2, pero 3 grupos independientes han comprobado una relación significativa con el desarrollo de enfermedad venooclusiva (EPVO) lo que apoya la suposición de que ambas, HAPI y EPVO son dos aspectos de un solo proceso, determinado por una carga genética común, cuya distinta expresión depende de la influencia de otros factores. La forma de transmisión de la alteración es autosómica dominante, aunque con baja penetrancia, es decir, sólo un 20% de los individuos con la mutación expresan la enfermedad lo que indica que para su desarrollo se requiere la coexistencia de otros factores, genéticos o no. Hay un claro predominio femenino (2:1), que algunos atribuyen a que este biomarcador puede condicionar un incremento de muerte fetal en varones. La expresividad clínica que confiere es muy variable y en general, cada generación enferma de modo cada vez más precoz (fenómeno de anticipación genética). Las mutaciones en BMPR2 tienen, además de su utilidad para el estudio de susceptibilidad, un cierto valor en la predicción de la gravedad y curso clínico: se relaciona con una menor edad de inicio y en el fallecimiento, mayor gravedad hemodinámica, menor respuesta a la prueba vasodilatadora y peores resultados con tratamiento.

Los pacientes con telangiectasia heredo-familiar hemorrágica (síndrome de Rendu-Osler-Weber) presentan con frecuencia HAP relacionada con otro receptor miembro de la familia del TGFβ: ALK1 (*activin-like-kinasa*) que, como la mutación del BMPR-2, da lugar a inhibición de la proliferación endotelial y de apoptosis mediada por las SMADS⁵.

La serotonina (5HT) actúa como estímulo para la proliferación del músculo liso endotelial en modelos experimentales. La mutación del gen de su transportador (5-HTT) genera incremento de dichos efectos en las células musculares lisas vasculares; su prevalencia es mayor en pacientes con HAPI en relación con controles⁵. La hipoxia induce incremento en la expresión del receptor 5-HT2B. La nor-dexfenfluramina, metabolito activo del anorexígeno dexfenfluramina, es agonista de este receptor y provoca HAP⁵. Otros fármacos (anfetaminas, metanfetaminas y cocaína) podrían interactuar también con él.

Los genes SNP (*single nuclear polymorphism*) difieren de los normales en un único nucleótido y pueden modificar la susceptibilidad para el desarrollo de HAP⁶. Se han descrito dichas modificaciones para otros genes diferentes de los mencionados, concretamente para los que codifican el *transient receptor potential channel 6* (TRPC6)⁶ o el transportador de los canales de potasio Kv1.5 (KCN A5)⁷. Nuevamente, las modificaciones genéticas no sólo traducen susceptibilidad sino que además confieren características especiales: las de TRPC6 incrementan la activación del factor inflamatorio de transcripción nuclear NF- κ B mientras que las de KCNA5 se asocian a la variante de HAP relacionada con el consumo de fenfluramina⁷. Los pacientes con conectivopatías, especialmente con esclerosis sistémica (ES), constituyen un contingente cada vez más importante en el grupo 1 (HAP) de la clasificación de Dana Point. En ellos no se ha comprobado relación alguna con los marcadores genéticos que hemos mencionado. Sin embargo, trabajos muy recientes han podido seleccionar determinadas modificaciones genéticas que se relacionan con susceptibilidad para el desarrollo de HAP: menor frecuencia del alelo 6bINS (polimorfismo en el intron 7 del gen de endoglin)⁸, así como asociación negativa con las variante rs10744676 del gen KCNA5⁷, y rs344781 del gen UPAR⁹. Agarwal comunicó una asociación negativa con determinados polimorfismos de interleucina 23 (IL-23)¹⁰, circunstancia que no hemos comprobado en un trabajo multicéntrico posterior¹¹.

Biomarcadores relacionados con el fallo del ventrículo derecho

A lo largo de la evolución de la enfermedad se produce un deterioro progresivo del ventrículo derecho puesto de manifiesto mediante un conjunto de marcadores entre los que destacan los péptidos natriuréticos, la troponina y proteína transportadora de ácidos grasos específica del miocardio.

Péptidos natriuréticos

El BNP es una hormona segregada principalmente por los ventrículos, en respuesta a sobrecarga de presión, como propéptido (proBNP) que se fragmenta en BNP (activo, con una vida media de 20 min) y otro componente, NT-proBNP (inactivo pero con una vida media más larga, de 60 a 120 min, lo que lo hace más apto para su interpretación). La acción fisiológica de BNP se ejerce sobre el riñón (inhibe la secreción de renina/aldosterona por lo que provoca natriuresis e incremento del filtrado glomerular), sobre los vasos (disminuye el tono arterial y venoso; tiene efecto antiproliferativo), sobre el corazón (efecto antifibrótico y antiproliferativo) y sobre el sistema nervioso (incremento del tono vagal). Los valores normales se sitúan por debajo de 100 pg/ml para BNP y 125 pg/ml para NT-PBNP (450 en mayores de 75 años). Hay que tener en cuenta, para su interpretación, factores que modifican estos valores, bien aumentándolos (esfuerzo, insuficiencia renal, enfermedad pulmonar, hipertensión arterial, hipertiroidismo, tratamiento con glucocorticoides, cirrosis hepática con ascitis o hemorragia subaracnoidea) o disminuyéndolos (obesidad, tratamiento con inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, bloqueadores beta, espironolactona y otros diuréticos). Nagaya¹², en 1998, observó que la concentración de BNP se elevaba en relación con el deterioro de los parámetros hemodinámicos en pacientes con HP. Dos años más tarde, comprobó que pacientes con valores basales de BNP > 150 pg/ml tenían una supervivencia menor que el resto (como predictor de mortalidad, BNP fue incluso superior a los parámetros hemodinámicos); dichos valores, en supervivientes, disminuyeron significativamente durante un seguimiento de 3 meses mientras que ascendieron progresivamente en el resto¹³. El pronóstico fue especialmente desfavorable cuando fueron superiores a 180 pg/ml¹³. Leuchte et al¹⁴ realizan un seguimiento más largo (12 meses) sobre 30 pacientes con HAP y comprueban que los cambios en la concentración de NT-proBNP guardan paralelismo con los cambios hemodinámicos y funcionales y aconsejan su utilización sistemática para el seguimiento. El estudio REVEAL estableció el valor de 1.500 pg/ml como punto de corte para la predicción de mal pronóstico¹⁵. La determinación de BNP o de NT-proBNP ha resultado útil también en la estratificación de los pacientes (paralelamente a la CF) y en la valoración de la respuesta al tratamiento con sildenafil¹⁶, bosentan¹⁶, ambrisentan¹⁵ o trespitinil¹⁷. En pacientes pertenecientes a grupos de riesgo, concretamente con ES, en los que los valores basales de NT-ProBNP son superiores a los observados en pacientes con HAPI, las determinaciones de NT-proBNP han sido útiles para la detección de aquellos con mayor probabilidad de desarrollar HAP. En un grupo de 33 pacientes con ES, sin HAP, seguidos a lo largo de 2 años, determinamos la concentración de NT-proBNP en situación basal y tras esfuerzo. Los valores, en el grupo que desarrolló HAP, fueron sensiblemente más elevados, tanto en reposo ($p = 0,001$) como en esfuerzo ($p = 0,002$)¹⁸. El punto de corte, para la detección de mayor riesgo, fue de 200 pg/ml (sensibilidad del 80%; especificidad del 100%)¹⁴, algo inferior al de 390 pg/ml establecido por otros¹⁵. La asociación de un descenso desproporcionado de la difusión respecto a la capacidad vital forzada (D_{lco}/CFF) con valores elevados de NT-proBNP, incrementa aún más el índice de sospecha en este grupo de pacientes en riesgo de HAP¹⁹.

Troponina-T

La troponina-T cardiaca (cTnT) es un marcador específico de daño miocárdico que se emplea en rastreo de isquemia e infarto miocárdico.

co. Su elevación, en pacientes con HAP, se debe tanto a la disminución del gradiente de perfusión coronaria, secundaria al descenso de la presión sistémica, como al trastorno de la perfusión miocárdica²⁰. Torbicki comprobó elevación de cTnT (concentración detectable; cTnT > 0,01 ng/ml) en el 14% de los pacientes con HP precapilar crónica con una fuerte correlación con la resistencia vascular pulmonar (RVP) y la distancia recorrida en la PM6M²⁰. Dado que la elevación de la concentración de cTnT es secundaria a sufrimiento miocárdico resulta de interés en el seguimiento de los pacientes pero es poco útil para diagnóstico precoz.

Proteína transportadora de ácidos grasos específica del miocardio

Se trata de una proteína intracelular, específica del miocardio, que no se detecta en sangre en condiciones normales pero que difunde rápidamente al lesionarlo. Su mayor sensibilidad y especificidad le confieren ventajas sobre la cTnT²¹. Puede detectarse en plasma mucho más precozmente que otros marcadores (cTnT, mioglobina o fracción MB de creatinina) en isquemia coronaria aguda y es de utilidad en el seguimiento de la insuficiencia cardíaca crónica²². Se ha comprobado que es un predictor altamente sensible y específico de mortalidad y curso clínico en el tromboembolismo pulmonar agudo, en la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC) y en el seguimiento de pacientes sometidos a tromboendarterectomía²¹. No hay experiencia acerca de su utilidad en pacientes con HAP (grupo I de la Organización Mundial de la Salud) pero la similitud, en muchos aspectos, entre estos y los pacientes con HPTEC, justificarían la inclusión de H-FABP en el espectro de biomarcadores útiles para el seguimiento de la HAP⁴.

Biomarcadores de disfunción endotelial

En los pacientes con HAP se han encontrado profundas alteraciones en la producción endotelial de elementos implicados en el mantenimiento del tono muscular (endotelinas, prostanoïdes, óxido nítrico). Su cuantificación proporciona marcadores muy útiles en la valoración del daño endotelial⁴.

Endotelinas

Las endotelinas (ET), familia de polipéptidos de 21 aminoácidos (ET-1, ET-2 y ET-3), tienen un importante papel en la regulación del tono de los vasos y de la proliferación de sus elementos musculares. La ET-1 se sintetiza en las células endoteliales a partir de la preproendotelina, precursor de 212 aminoácidos, por la acción sucesiva de endopeptidasa (que da lugar a un péptido de 38 aminoácidos, «big-ET-1») y la enzima convertidora de endotelina. Su síntesis está inducida por la influencia, sobre su regulación genética, de numerosos factores tales como hipoxia, frío, isquemia, estrés mecánico, catecolaminas, vasopresina, angiotensina II, factores de crecimiento (especialmente TGF β) y otras citocinas (factor de necrosis tumoral alfa, IL-1, IL-2), insulina, leptina, trombina, bradichina, o concentraciones elevadas de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad oxidado o glucosa. Por el contrario, el NO, la prostaciclina, el péptido natriurético B y los tratamientos con estatinas, bloqueadores beta, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina y vasodilatadores, reprimen su producción. Todo ello debe tenerse en cuenta en el momento de su valoración. En los pacientes con HAP o con HP de otras causas se han detectado valores elevados de ET-1 y big-ET-1, tanto en sangre como en tejido pulmonar, y una expresión elevada de sus receptores en las lesiones plexiformes. Dichos valores poseen un fuerte impacto pronóstico y se correlacionan con el índice cardíaco (IC), la presión arterial pulmonar media (PAPm), la RVP y el resultado de la PM6M¹⁹, especialmente los de big-ET1, ya que su vida media plasmática es mayor que la de la forma «madura», que es aclarada, durante su paso pulmo-

nar, por los receptores ET_B²³. La determinación de ET-1 y big-ET1 podría ser también útil para valorar la respuesta terapéutica, ya que se ha comprobado su descenso en pacientes con HAP que responden favorablemente durante el tratamiento con prostanoides (epoprostenol o iloprost)^{23,24}. Paradójicamente, la concentración de ET-1 se eleva en pacientes tratados con bosentán (debido al bloqueo de su aclaramiento, que depende de los receptores ET_B, cuya función también resulta inhibida por bosentán). El pico máximo de ET-1 en respuesta al tratamiento con bosentán se asocia negativamente a la gravedad de la HAP (medida por la PAP) por lo que se ha sugerido que la respuesta de ET-1 plasmática a bosentán podría emplearse como marcador de la gravedad de la HAP²⁵. La ET-3, al contrario que la ET-1, se encuentra descendida en los pacientes con HAP. En un estudio realizado por Montani et al²⁶, ET-1 se correlacionó positivamente con la presión de aurícula derecha (PAD) y la RVP, y negativamente con el IC y la saturación de O₂ en sangre venosa mixta (Svo₂); ET-3 se correlacionó positivamente con la PM6M. Por último, el cociente ET-1/ET-3 se correlacionó positivamente con la PAD y la CF y negativamente con la PM6M y la Svo₂. Su descenso se asoció con una mejoría del pronóstico en pacientes tratados²⁶. De momento, la utilidad de las ET, como biomarcadores, está limitada al terreno de la investigación.

Dímeros D

Los dímeros D (DD) constituyen un valioso marcador de trombosis venosa. Los estudios de autopsia han demostrado la presencia de trombosis in situ en un 50% de casos con HAP y, en un estudio sobre un reducido número de pacientes, se comunicó una elevación de los DD, en comparación con controles, que se correlacionó positivamente con la gravedad de la enfermedad y negativamente con la supervivencia al año. Son precisos estudios más extensos para valorar la utilidad de este marcador⁴.

Factor von Willebrand

El factor von Willebrand (vWF) desempeña un importante papel en el proceso de formación del coágulo en vasos lesionados y su determinación en plasma se ha empleado como marcador de daño endotelial. Su concentración está elevada basalmente en pacientes con HAP (en los que se aprecia además una proteólisis anormal del vWF) y se han correlacionado con la gravedad y el riesgo de muerte. Collados²⁷ comprobó que las concentraciones de vWF y de sus multímeros largos eran más altas, y su contenido en ácido siálico más bajo, en pacientes «no respondedores» a agentes vasodilatadores (proponen su valoración cuantitativa y cualitativa como marcador pronóstico) y Veyradier²⁸ observó un descenso de vWF (junto a normalización en las alteraciones de su proteólisis), paralelo a la mejoría hemodinámica, en un grupo de 10 pacientes a los 30 días de tratamiento con prostaciclina. Tampoco el vWF se utiliza habitualmente en clínica en pacientes con HAP⁴.

Otros biomarcadores

Valores elevados de ácido úrico (AU) en pacientes con fallo cardíaco se han relacionado con incremento de la mortalidad. El mecanismo no es bien conocido pero se supone que traduce alteraciones oxidativas. La producción de AU depende de la acción de xantina-oxidasa sobre xantina y, en pacientes con insuficiencia cardíaca, el bloqueo de xantina-oxidasa con alopurinol mejora la función²⁹, por lo que se puede deducir que dicha enzima interviene de alguna manera en la patogenia del proceso³. En pacientes con HAP, la concentración de AU se correlaciona con los datos hemodinámicos, con la mortalidad y con la respuesta al tratamiento⁴ pero hay que tener en cuenta factores modificadores como edad, sexo, disfunción renal o tratamiento diurético en la interpretación de los resultados. La dimetil-arginina asimétrica procede del catabolismo proteico y es un inhibidor competitivo de la

NO-sintetasa. Se ha destacado recientemente su importancia como marcador, en distintas variantes de HP⁶, con una buena correlación con valores hemodinámicos y supervivencia²⁹. En pacientes con HP-TEC sometidos a tromboendarterectomía, se ha sugerido que un valor > 0,64 mmol/l⁻¹ sería el punto de corte que distinguiría a pacientes con arteriopatía de pequeño vaso²⁹. Heresi et al¹⁵ demostraron que valores elevados de ligando 10 de quimiocina CXC (CXCL10), un inhibidor de la angiogénesis, se asocia a un mejor pronóstico. Ciertos marcadores inmunológicos tienen interés por su relación con la posibilidad de desarrollo de HAP en pacientes con ES, tanto algunos antígenos del sistema HLA (B35, DRw6 y DRw52), como determinados autoanticuerpos: anti-centrómero, anti-B23 (proteína nucleolar de proliferación celular), anti-U3-RNP y anti Th/To; los dos últimos se asocian a una mayor frecuencia de HAP-fibrosis pulmonar.

Otros biomarcadores propuestos, aunque mucho menos utilizados, y relacionados con la inflamación son el incremento de la proteína C reactiva, especialmente en HP asociada a enfermedad de Gaucher³⁰, la depresión de los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, la elevación de determinadas citocinas, como factor de transformación de crecimiento-15³¹, IL-6, IL-8, IL-10 y IL-12p70³², las modificaciones de angiopoyetina-2³³ y de matriz-metaloproteinasas-9³³ o la presencia de niveles elevados de micropartícula endotelial CD62e³⁴. Por último, es importante mencionar que estudios muy recientes, que han establecido diferencias cuantitativas notables en la expresión de proteínas del pulmón de pacientes con HAP en comparación con controles, bien por exceso (periostina, CLIC-1, CLIC-4), bien por defecto (haptoglobina, vinculina)³⁵, abren nuevas posibilidades en el conocimiento de la patogenia y en el descubrimiento de nuevos marcadores de la HAP.

Conclusión

Los biomarcadores actuales y en desarrollo (dentro del campo de la genómica, la proteómica y la transcriptómica)³⁴ constituyen un excelente instrumento en la valoración de la predisposición, el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con HAP. No obstante, no deben valorarse aisladamente, sino integrarse en el conjunto de parámetros clínicos y hemodinámicos con utilidad demostrada en la toma de decisiones.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

- Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:89-95.
- Rhodes SL, Wharton J, Wilkins M. Biomarkers in pulmonary hypertension. *PVRI Rev.* 2009;1:28-30.
- Van Albada ME, Loot FG, Fokkema R, Roofthoof MTR, Berger RMF. Biological serum markers in the management of pediatric pulmonary arterial hypertension. *Pediatr Res.* 2008;63:321-7.
- Rafeq S, Shah AM, Preston IR. Biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Int J Clin Pract.* 2009;63 Suppl. 162:36-41.
- Austin ED, Loyd JE, A. Phillips JA. Genetics of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30:386-98.
- Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation.* 2010;121:2045-66.
- Wipff J, Dieudé P, Guedj M, Ruiz B, Riemekasten G, Czacowski JL, et al. Association of a KCNA5 gene polymorphism with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in the European Caucasian population. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3093-100.
- Wipff J, Kahan A, Hachulla E, Sibilia J, Cabane J, Meyer O, et al. Association between an endoglin gene polymorphism and systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:622-5.
- Manetti M, Allanore Y, Revillod L, Fatini C, Guiducci S, Cuomo G. A genetic variation located in the promoter region of the UPAR (CD87) gene is associated with the vascular complications of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:247-56.

10. Agarwal SK, Gourh P, Shete S, Paz G, Divecha D, Reveille JD, et al. Association of Interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009;36:2715-23.
11. Rueda B, Broen O, Torres O, Simeon C, Ortego-Centeno N, Schrijvenaars MM, et al. The interleukin 23 receptor gene does not confer risk to systemic sclerosis and is not associated with systemic sclerosis disease phenotype. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:253-6.
12. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, et al. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:202-8.
13. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 2000;102:865-70.
14. Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Neurohr C, Vogeser M, Behr J. Characterization of brain natriuretic peptide in long-term follow-up of pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2005;128:2368-74.
15. Heresi GA. Clinical perspective: biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Int J Clin Pract.* 2011;65 Suppl 169:5-7.
16. Wilkins MR, Paul GA, Strange JW, Tunariu N, Gin-Sing W, Banya W, et al. Sildenafil versus endothelin receptor antagonist for pulmonary hypertension (SERAPH) study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1292-7.
17. McLaughlin VV, Benza RL, Rubin LJ, Channick RN, Voswinckel R, Tapson VF, et al. Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1915-22.
18. Ortiz A, Ronquillo M, G^a Hernández F, López JE, Ocaña C, Sánchez Román J, et al. Determinación de péptidos natriuréticos como marcador de riesgo para el desarrollo precoz de hipertensión pulmonar. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63 Supl 3:36.
19. Allanore Y, Borderie D, Avouac J, Zerkak D, Meune C, Hachulla E, et al. High N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and low diffusing capacity for carbon monoxide as independent predictors of the occurrence of precapillary pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:284-91.
20. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, Fijalkowska M, Sikora J, Florczyk M, et al. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation.* 2003;108:844-8.
21. Lankeit M, Dellas C, Panzenbock A, Skoro-Sajer N, Bonderman D, Olschewski M, et al. Heart-type fatty acidbinding protein for risk assessment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2008;31:1024-9.
22. Nakata T, Hashimoto A, Hase M, Tsuchihashi K, Shimamoto K. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome. *Cardiology.* 2003;99:96-104.
23. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest.* 2001;120:1562-9.
24. Wilkens H, Bauer M, Forestier N, König J, Eichler A, Schneider S, et al. Influence of inhaled iloprost on transpulmonary gradient of big endothelin in patients with pulmonary hypertension. *Circulation.* 2003;107:1509-13.
25. Hiramoto Y, Shioyama W, Kuroda T, Masaki M, Sugiyama S, Kitaro Okamoto K. Effect of bosentan on plasma endothelin-1 concentration in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2007;71:367-9.
26. Montani D, Souza R, Binkert C, Fischli W, Simonneau G, Crozet M, et al. Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic of pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2007;131:101-8.
27. Collados MT, Sandoval J, López S, Massó FA, Páez A, Borbolla JR, et al. Characterization of von Willebrand factor in primary pulmonary hypertension. *Heart Vessels.* 1999;14:246-52.
28. Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, Wolf M, Sitbon O, Simonneau G, et al. Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2000;102:2460-2.
29. Warwick G, Thomas PS, Yates DH. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2008;32:503-12.
30. Elstein D, Nir A, Klutstein M, Rudensky B, Zimran A. C-reactive protein and NT-proBNP as surrogate markers for pulmonary hypertension in Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;34:201-5.
31. Rhodes CJ, Wharton J, Howard L, Gibbs JSR, Aldashev AA, Wilkins MR. Growth differentiation factor-15 as a biomarker in pulmonary arterial hypertension and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2009;120:S1135.
32. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;122:920-7.
33. Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, Shanmugasundaram S, Banger S, Shapiro L, et al. Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:137-49.
34. Amabile N, Heiss C, Chang V, Angeli FS, Damon L, Rame EJ, et al. Increased CD62^e endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28:1081-6.
35. Abdul-Salam VH, Wharton J, Cupitt J, Berryman M, Edwards RJ, Wilkins MR. Proteomic analysis of lung tissues from patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010;122:2058-67.