

Sílvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo

Efeitos cardiovasculares do citrato de sildenafil
na miocardiopatia hipertensiva induzida pela
inibição da síntese de óxido nítrico em ratos

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da
Farmacêutica – Sílvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo.*

Campinas, 28 de maio de 2005.

*Prof. Dr. Heitor Moreno Junior
- Orientador -*

Campinas

2005

Sílvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo

Efeitos cardiovasculares do citrato de sildenafil
na miocardiopatia hipertensiva induzida pela
inibição da síntese de óxido nítrico em ratos

Tese apresentada à Pós – Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Campinas

2005

III

BC
MADA
UNICAMP
EX
BC/ 69805
2.123.06
D
11.00
30-8-06

ID 385904

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M492e

Melo, Silvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de
Efeitos cardiovasculares do citrato de sildenafil na miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição da síntese de óxido nítrico em ratos / Silvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Heitor Moreno Júnior
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido Nítrico. 2. Inibidores de Fosfodiesterase. 3. Sildenafil. 4. Hipertensão. 5. Cardiomegalia. 6. Miocardiopatias. I. Moreno Júnior, Heitor. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slr/fcm)

Título em inglês: *Cardiovascular effects of sildenafil citrate in hypertensive miocardiopathy induced by nitric oxide reduced in rats*

Keywords: • Nitric oxide
• Hypertension
• Heart hypertrophy
• Phosphodiesterase
• Sildenafil
• Cardiomiopathy

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr Heitor Moreno Júnior
Profa. Dra. Marta Helena Krieger
Prof Dr Wilson Nadruz
Prof Dr José Eduardo Tanus Santos
Prof Dr Francisco Rafael Laurindo

Data da defesa: 25/04/2005



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Membros:

Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Prof. Dr. Wilson Nadruz

Prof. Dr. José Eduardo Tanus - Santos

Prof. Dr. Francisco Rafael Laurindo

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28/04/2005

Dedicatória

*Aos meus pais, José e Celeste, por me
mostrarem caminhos pelos quais crescer e
me conduzirem de maneira tal que eu
pudesse aprender como ser forte e viver.*

*Por estarem sempre ao meu lado,
acreditar e participar ativamente de
cada um dos meus sonhos.*

Agradecimentos

À Deus, que recebe sempre em primeiro lugar os meus agradecimentos sinceros, que me fortalece, me dá o ânimo para não desistir luta, que enxuga as lágrimas de cansaço e desespero quando tudo parece perdido, mas que também se fez presente em cada momento de felicidade, em cada conquista....

Ao Fabrício, meu querido irmão, por sempre estar por perto e ser companheiro. Por ser exemplo de coragem e determinação e por saber dar a palavra irmão um significado maior que as palavras podem expressar.

À minha querida irmã Halyne que se fez presente em todos os momentos, me apoiando e incentivando com palavras de força e carinho. Por nossas conversas e por me fazer rir quando isso parecia ser impossível. Esse dom é só dela... Mas principalmente, por me dar o prazer e o orgulho de ser sua irmã.

À minha avó Elisa e aos meus tios, Darci e Márcia, Elisinha, Maria Eugênia, Nino e Elaine, por toda torcida, carinho, ajuda e apoio.

Ao Juan Carlos Yugar Toledo, meu companheiro de doutorado, pelos momentos compartilhados, lições aprendidas, apoio e companheirismo.

Aos meus amigos, Alessandra Linardi, Bruno Rodrigues, Cristiano Mostarda, Fernanda Lamo, Jaqueline Rocha, Juliano Schwartx, Paula Arruda, Patrícia Fiorino, Patrícia Panunto, Raquel de La Fuentes, Rodrigo Plentx e Walnéia de Souza, pela força, incentivo e pronta colaboração sempre que precisei. Com amigos como vocês, não importa onde eu me encontre, jamais sofrerei de solidão. Poderei morrer de saudade..... Mas, com certeza, não estarei só.

À querida Valéria Frigato, amiga e companheira de trabalho, por toda ajuda e colaboração, conversas e agradáveis momentos que passamos juntas.

Ao Adilson Thomaz, que esteve bem próximo no meu dia-a-dia, dividindo as dificuldades, agonias e alegrias; dando-me apoio e força para continuar. Teria sido muito mais difícil sem ele por perto.

Ao querido Edson Moreira, pelo carinho, amizade, conversas e trabalhos. Tenho certeza que ele sabe o quanto “eu o odeio”...

À Profa. Dra. Jara de Lucca pelos ensinamentos científicos, colaborações, conversas e agradável companhia.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por todo auxílio e pronta colaboração.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, por todo auxílio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Otávio Rixxi pelo auxílio que a execução desse projeto.

Ao Fumio Ida (in memoriam), pelos ensinamentos e lições de vida.

Ao Wanderlei, por toda ajuda e amizade tão querida.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia da UNICAMPe da divisão experimental do INCOR por toda ajuda e colaboração.

À Pfizer que gentilmente nos forneceu a droga utilizada no projeto.

À FAPESP pela bolsa de estudos, apoio e incentivo à pesquisa.

À CAPES, FAEP e CNPq pelo auxílio e apoio científico.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Heitor Moreno Jr, pela orientação precisa, experiente, sincera e amiga. Pela confiança em mim depositada no momento em que aceitou ser meu orientador. E, principalmente, por me ensinar a voar num limite provável; a lutar, quando é fácil ceder; e a conquistar, o “inatingível” chão, me emprestando seus “olhos de tigre” e “coração de leão”.

Você sempre será, para mim, exemplo e referência...

À Profa. Dra. Maria Cláudia Frigoyen, pelo carinho que me recebeu em seu laboratório, sendo sempre um modelo de equilíbrio, competência e serenidade. Pelos ensinamentos e conversas que me fizeram seguir em frente e por ter sido um “porto seguro” no momento de turbulência.

À Profa. Dra. Silvia Lacchini, nunca terei palavras exatas para agradecer sua amizade e colaboração. Por sua extrema competência profissional e generosidade pessoal, pelo seu carinho, conversas e ensinamentos que tornaram o final dessa jornada extremamente agradável e rico em todos os aspectos. Você, amiga e mestre, é exemplo de realização e sucesso que nos faz ter vontade de continuar sempre!

"Rir muito e com freqüência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso."

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

	Página
Lista de Abreviaturas.....	28
Lista de Figuras.....	37
Lista de Tabelas.....	41
Resumo.....	45
Introdução.....	53
1. Óxido Nítrico.....	54
1.1. Síntese do Óxido Nítrico.....	54
1.2. Mecanismo de Ação.....	56
1.3. Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico.....	59
1.4. Inibição da Síntese de Óxido Nítrico.....	60
2. Nucleotídeos Cíclicos.....	63
2.1. GMPc.....	64
2.2. AMPc.....	67
3. Fosfodiesterases.....	69
3.1. Fosfodiesterases e Sistema Cardiovascular.....	70
3.2. Fosfodiesterase 5.....	72
3.3. Inibidores de Fosfodiesterases.....	73
3.4. Disfunção endotelial e Comprometimento cardíaco.....	77
Objetivos.....	80
Materiais e Métodos.....	82
1.Considerações Gerais.....	83
2. Grupos Experimentais.....	83
3. Avaliação do peso corporal e pressão arteria de cauda.....	84
4. Avaliações Hemodinâmicas.....	84
4.1. Avaliação da pressão arterial média (PAM).....	84
4.2. Fluxo Aórtico.....	86
4.3. Resistência Vascular Periférica Total (RVPT).....	88
5. Avaliações Histológicas.....	88
5.1. Coleta e processamento dos tecidos.....	88
5.2. Determinação da massa miocárdica.....	89

5.3. Avaliações Morfométricas.....	90
5.3.1. Diâmetro de Miócito.....	90
5.3.2. Lesões Miocárdicas.....	90
5.3.3. Espessura da Camada Média Vascular.....	91
5.4. Imunohistoquímica.....	92
5.4.1. Análises quantitativas.....	94
5.4.2. Análises semi-quantitativas.....	95
6. GMPc plasmático.....	96
7. Análise estatística.....	96
Resultados.....	97
1. Avaliação do peso corporal e pressão arteria de cauda.....	98
2. Avaliações Hemodinâmicas.....	100
2.1. Avaliação da pressão arterial média (PAM).....	100
2.2. Fluxo Aórtico.....	101
2.3. Resistência Vascular Periférica Total (RVPT).....	102
3. Avaliações Histológicas.....	103
3.1. Determinação da massa miocárdica.....	103
3.2. Avaliações Morfométricas.....	103
3.2.1. Diâmetro de Miócito.....	103
3.2.2. Lesões Miocárdicas.....	103
3.2.3. Espessura da Camada Média Vascular.....	106
3.3. Imunohistoquímica.....	108
3.3.1. Análises quantitativas.....	108
3.3.2. Análises semi-quantitativas.....	113
4. GMPc plasmático.....	114
Discussão.....	115
Conclusões.....	126
Summary.....	128
Referências Bibliográficas.....	130

Lista de Abreviaturas

pg	Picograma (unidade de medida de peso)
µm	Micrograma (unidade de medida de peso)
5'AMP	5'adenosina monofosfato
5'GMP	5'guanosina monofosfato
AC	Adenilato Ciclase
Ac	Anticorpo
AF	Área de Fibrose
AM	Área marcada
AMPc	3',5'adenosina monofosfato cíclico
ANP	Peptídeo Atrial Natriurético
AT	Área total
AT₁	Receptor de angiotensina tipo 1
AT₂	Receptor de angiotensina tipo 2
ATP	adenosina tri-fosfato
BNP	Peptídeo Cerebral (<i>Brain</i>) Natriurético
Ca⁺⁺	Cálcio
Ca⁺²/CaM	Complexo cálcio/calmodulina
CaM	Calmodulina
CE	Célula endotelial
CMV	Camada média vascular
CMVL	Célula do músculo vascular liso
CNP	Peptídeo Natriurético – tipo C
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
CYP₄₅₀	Sistema de citocromos P450
DAB	3,3 diaminobenzidina
DC	Débito cardíaco
DE	Diâmetro externo
DI	Diâmetro interno
DM	Diâmetro de miócito
DP	Desvio padrão da média

ECA	Enzima conversora de angiotensina
eNOS	Enzima óxido nítrico sintetase endotelial
FC	Frequência cardíaca
Fe⁺²	Ferro
g	Gramas (unidade de medida de peso)
GC	Guanilato ciclase
GC_p	Guanilato ciclase particulada
GC_s	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Guanosina bi-fosfato
GMPc	guanosina-3',5'-monofosfato cíclica
GTP	Guanosina tri-fostato
HA	Hipertensão arterial
IC	Débito cardíaco estimado
IgG	Imunoglobulina tipo G
IM	Intensidade de marcação
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetase induzível
IPCt	Índice do peso cardíaco total
IPVE	Índice do peso do ventrículo esquerdo
kg	Quilograma (unidade de medida de peso)
L-NAA	N ^ω -amino-arginina
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N ^ω -monometil-L-arginina
L-NOARG	N ^G -nitro-L-arginina
MC	Membrana celular
mg	Miligrama (unidade de medida de peso)
min	Minuto
ml	Mililitro(unidade de medida de volume)
mmHg	Milímetro de mercúrio
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio
nNOS	Enzima óxido nítrico sintetase neuronal

NO	Óxido nítrico
NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
NOS	Enzima óxido nítrico sintetase
NTS	Núcleo do trato solitário
O₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
PAC	Pressão arterial de cauda
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato
PC	Peso corporal
PCt	Peso cardíaco total
PDE	Fosfodiesterase
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase ativada por AMPc
PKG	Proteína quinase ativada por GMPc
PVE	Peso do ventrículo esquerdo
RVPT	Resistência vascular periférica total
SEM	Erro padrão da média
SRA	Sistema renina angiotensina
UA	Unidade arbitrária de medida

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Reação de síntese do óxido nítrico.....	55
Figura 2. Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular.....	57
Figura 3. Domínios estruturais das Guanilatos Ciclases.....	65
Figura 4. Mecanismo de Ativação do AMPc.....	68
Figura 5. Estrutura Modular das PDEs.....	71
Figura 6. Estruturas comparativas do GMPc, cafeína e sildenafil.....	75
Figura 7. Mecanismo de <i>cross-talk</i> entre PDE3 e PDE5.....	76
Figura 8. Esquema analógico-digital de aquisição de dados da pressão arterial.....	85
Figura 9. Técnica cirúrgica da determinação de fluxo aórtico.....	87
Figura 10. Traçado representativo da determinação de fluxo aórtico.....	88
Figura 11. Mecanismo da técnica de imunohistoquímica.....	93
Figura 12. Representação da técnica de determinação de intensidade de marcação nas análises quantitativas das imunohistoquímicas.....	95
Figura 13. Gráfico da avaliação da PAC durante as 8 semanas de tratamento.....	99
Figura 14. Gráfico da avaliação da PAM após 8 semanas de tratamento.....	100
Figura 15. Gráfico da avaliação do IC após 8 semanas de tratamento.....	101
Figura 16. Gráfico da avaliação da RVPT após 8 semanas de tratamento.....	102
Figura 17. Gráfico da avaliação das AF após 8 semanas de tratamento.....	104
Figura 18. Fotos representativas das AF após 8 semanas de tratamento.....	105
Figura 19. Gráfico da avaliação das CMV após 8 semanas de tratamento.....	106
Figura 20. Fotos representativas das CMV após 8 semanas de tratamento.....	107
Figura 21. Gráfico e fotos representativas da IHQ para PDE5 nos vasos do tecido cardíaco após 8 semanas de tratamento.....	109
Figura 22. Gráfico e fotos representativas da IHQ para PDE3 nos vasos do tecido cardíaco após 8 semanas de tratamento.....	110
Figura 23. Fotos representativas da IHQ para PDE3 nos vasos do tecido cardíaco após 8 semanas de tratamento.....	111
Figura 24. Gráfico e fotos representativas da IHQ para PDE3 nos vasos do tecido cardíaco após 8 semanas de tratamento.....	112
Figura 25. Gráfico das dosagens de GMPc plasmático após 8 semanas de tratamento.....	114

Lista de Tabelas

Tabela 1. Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de Imunohistoquímica.... **93**

Tabela 2. Determinação da massa miocárdica. Peso corporal (PC), peso cardíaco total (PCT), índice do peso cardíaco total (IPCT), peso ventricular esquerdo (PVE), índice do peso ventricular esquerdo e diâmetro de miócito (DM) nos grupos experimentais após 8 semanas..... **98**

Tabela 3. Quantificação semi-quantitativa da expressão da enzima eNOS nas células endoteliais dos vasos do tecido cardíaco..... **114**

Resumo

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico multifuncional que serve como molécula chave em muitos processos fisiopatológicos, sintetizado nas células endoteliais em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. Sua síntese se dá a partir da clivagem do terminal nitrogênio-guanidina do aminoácido L-arginina, em uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).

Há três isoformas de NOS: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS são isoformas expressas constitutivamente nas células endoteliais vasculares e nas células neuronais, respectivamente; e a iNOS que a forma induzível, expressa em células inflamatórias após a indução por citocinas e outros mediadores inflamatórios.

Após sua síntese o NO se difunde para as células do músculo liso vascular ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina-tri-fostato (GTP) em guanosina-3',5'-monofostato cíclica (GMPc), um segundo mensageiro para seus diversos efeitos biológicos, dentre os quais o relaxamento da musculatura lisa vascular.

A síntese de NO pode ser inibida por vários compostos análogos à L-arginina, como L-NMMA, L-NAA, L-NAME e L-NIO de forma dose-dependente. A inibição crônica da síntese de óxido nítrico pela administração crônica de L-NAME é um modelo complexo e bem estabelecido de hipertensão arterial e miocardiopatia hipertensiva. É caracterizado por elevação da pressão arterial (PA) de forma severa, redução na frequência cardíaca, no fluxo coronário e débito cardíaco (DC), aumento da resistência vascular periférica total (RVPT), diminuição do relaxamento vascular e alterações na contratilidade cardíaca, hipertrofia cardíaca, aumento do tamanho cardiomiócito, remodelamento miocárdico e microvascular com fibrose perivascular, sendo que o índice peso cardíaco/peso corporal e peso ventricular esquerdo/peso corporal estão usualmente aumentados.

As fosfodiesterases são enzimas que degradam os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc nas suas formas inativas. São conhecidas 11 famílias de enzimas (PDE1 – PDE11) que diferem com relação ao padrão distribuição, especificidade de substrato, regulação pelas PKs e proteínas ligantes. Estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como ereção peniana, asma, hipertensão pulmonar, aterosclerose, insuficiência cardíaca e diabetes. Consequentemente, os inibidores seletivos de PDE são interessantes e promissores alvos farmacológicos.

Os inibidores das PDEs inpedem a degradação do AMPc, GMPc, elevando seus níveis intracelulares. Esses inibidores mimetizam as estruturas do AMPc e GMPc, mas não são degradados. Sildenafil é um inibidor seletivo da PDE5 induzindo o relaxamento do músculo vascular liso e têm sido utilizados com sucesso no tratamento da disfunção erétil

A base racional para este projeto é a hipótese de que o sildenafil, por inibir de forma seletiva a PDE5 e consequentemente aumentar a disponibilidade de GMPc, possa ter efeitos cardiovasculares benéficos na inibição crônica da síntese de NO que reduz os níveis de GMPc no músculo cardíaco e vascular.

Para isso foram estudados 4 grupos experimentais divididos aleatoriamente em: CONTROLE, L-NAME, SILDENAFIL e SILDENAFIL + L-NAME, durante 8 semanas de tratamento. Analisamos as alterações hemodinâmicas através das medidas da pressão arterial média, débito cardíaco, frequência cardíaca e resistência vascular. As análises histológicas foram feitas através de técnicas morfométricas para determinação do diâmetro de miócito, lesões miocárdicas e espessura da camada média vascular e análises imunohistológicas.

Nossos resultados demonstraram que a administração crônica de sildenafil altera os padrões hemodinâmicos e histológicos do modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição da síntese de NO por L-NAME.

A inibição da PDE5 restaurou parcialmente os padrões hemodinâmicos, avaliados através da PA, DC e RVPT, além de protege parcialmente o miocárdio e músculo vascular liso contra as lesões e remodelamento cardiovascular característicos deste modelo experimental. A biodisponibilidade de GMPc, nos animais do grupo L-NAME + sildenafil, foi totalmente restaurada após 8 semanas de tratamento e a expressão das enzimas PDE3 e PDE5 estavam modificadas no músculo vascular liso e nos discos intercalares dos miócitos.

Dessa forma, concluímos que o sildenafil, através da inibição da PDE5, aumentando a biodisponibilidade do GMPc, resulta em um efeito cardioprotetor e antiproliferativo contra as alterações cardiovasculares descritas no modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição crônica da síntese de NO em ratos Wistar.

1. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico multifuncional que serve como molécula chave em muitos processos fisiopatológicos, como a regulação do tônus vascular (CORBIN e FRANCIS, 1999; GROSS e WOLIN, 1995; MONCADA et al., 1991), neurotransmissão (SALT et al., 2000), aprendizado e memória (QIANG et al., 1997). Seu baixo peso molecular e rápida difusão são propriedades que eliminam a necessidade de receptor ou presença de enzimas proteolíticas para sua sinalização. Em altas concentrações, o NO é também um agente citotóxico, envolvido em diversas condições críticas, participando desde doenças agudas como choque séptico (TITHERADGE, 1999) e derrame cerebral (IADECOLA, 1997) à transtornos degenerativos de longo prazo como esclerose múltipla (KRONCKE et al., 1998) e processos carcinogênicos (TAMIR e TANNENBAUM, 1996). Por causa de sua importância e envolvimento nos mecanismos fisiológicos e patológicos, sua regulação e síntese têm sido tão extensivamente estudados.

1.1. Síntese de Óxido Nítrico

A formação de NO ocorre em células endoteliais em resposta a agonistas tais como acetilcolina, histamina, ou bradicinina (FORSTERMANN et al., 1986). Sua síntese se dá a partir da clivagem do terminal nitrogênio-guanidina do aminoácido L-arginina (PALMER et al., 1988), tendo como produto intermediário a N^G-hidroxi-L-arginina, que é convertida em L-citrulina, em uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (HEMMENS e MAYER, 1998), com a presença de vários co-fatores como oxigênio (O₂), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e cálcio (dependendo do tipo de NOS), com conseqüente liberação de NO (MONCADA et al., 1988; MONCADA et al., 1988). **(Figura 1)**

Há três isoformas de NOS: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS são isoformas expressas constitutivamente nas células endoteliais vasculares e nas células neuronais, respectivamente. Estas isoformas dependem do complexo Ca^{++} /calmodulina para produzirem NO, liberando-o em baixas concentrações (ηM) e em condições fisiológicas. Já a iNOS é uma isoforma induzível, sua expressão é dependente de estímulo imunológico ou inflamatório (p.ex. $\text{TNF-}\alpha$, LPS, Interleucina-2 e Interferon γ) podendo ser expressa em uma variedade de células incluindo macrófagos, hepatócitos, células do músculo liso vascular e miócito cardíaco. Produz NO em condições patológicas e em altas concentrações (μM), por longos períodos (GRIFFITH e STUEHR, 1995). Embora a iNOS esteja principalmente expressa em células inflamatórias após a indução por citocinas e outros mediadores inflamatórios, também está presente constitutivamente em alguns tecidos e sua atividade é independente de Ca^{++} (ANDREW e MAYER, 1999; HECKER et al., 1999).

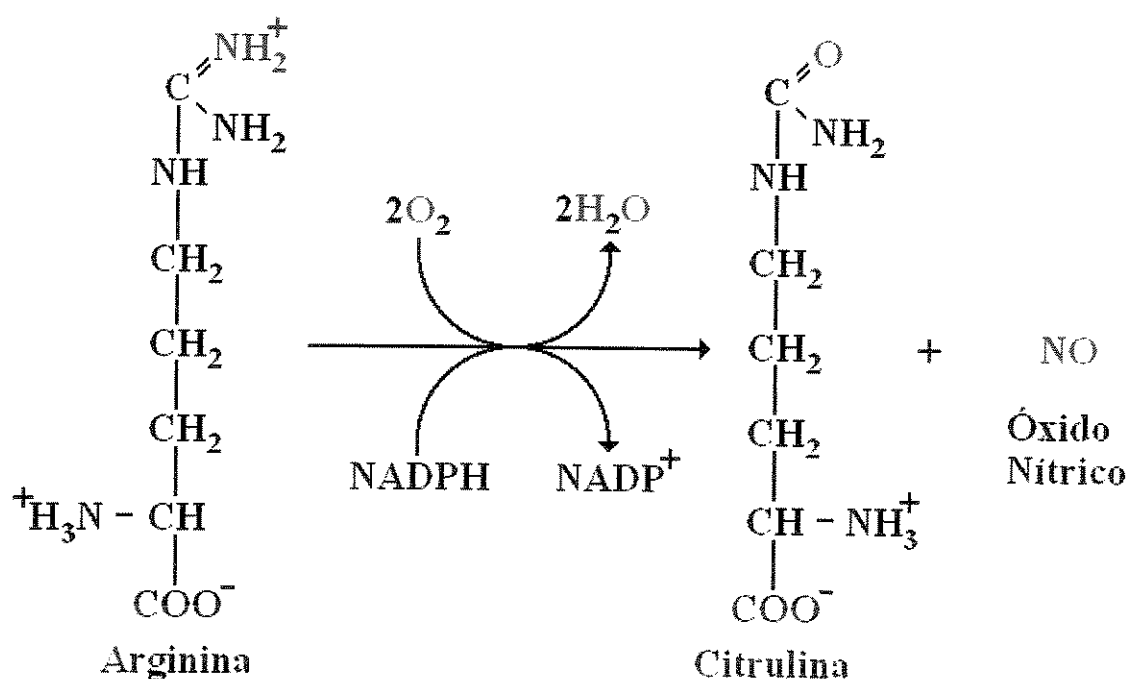


Figura 1. Reação de síntese de óxido nítrico (NO).

1.2. Mecanismo de ação

Após sua síntese no endotélio vascular, o NO, por ser uma molécula de pequena dimensão e altamente lipossolúvel, difunde-se para as células do músculo liso vascular ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (DENNINGER e MARLETTA, 1999; IGNARRO, 1991). Uma vez ativada, a GCs converte guanosina-tri-fostato (GTP) em guanosina-3',5'-monofostato cíclica (GMPc), um segundo mensageiro para seus diversos efeitos biológicos, dentre os quais o relaxamento da musculatura lisa vascular (WALDMAN e MURAD, 1987). **(Figura 2)** Sua meia-vida é extremamente curta, de um a cinco segundos (CLANCY et al., 1992; KILO et al., 2000; SMITH et al., 1992). *In vivo*, o NO é rapidamente oxidado a nitrito (NO_2^-) e, posteriormente, a nitrato (NO_3^-), o qual é eliminado na urina (BUGA et al., 1991).

Muitas células são capazes de sintetizar o NO, e dependendo do local de síntese, da quantidade produzida, do tipo de isoenzima envolvida na sua liberação e do microambiente onde vai atuar, o NO exerce diferentes ações. Quando pequenas quantidades são liberadas nos terminais nervosos, o NO atua como neurotransmissor, regulando desde o relaxamento de esfíncteres no sistema gastrointestinal até a transmissão de estímulos no sistema nervoso central, em áreas como a memória (FIN et al., 1995) ou o olfato (OKERE et al., 1996). Quantidades similares, porém, se liberadas pelas células endoteliais, regulam o relaxamento da musculatura lisa adjacente, explicando a vasodilatação. As quantidades maiores produzidas, conseqüentes a uma cadeia de estímulos, envolvendo sistema enzimático iNOS, podem ocasionar ou ampliar processos inflamatórios em vários órgãos.

O NO exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo*, que são em parte dependentes do GMPc (FORSTERMANN et al., 1986; MONCADA et al., 1991). Pode atuar diretamente em canais de potássio dependentes de cálcio, levando a uma hiperpolarização dependente do endotélio nos vasos, que resulta em vasodilatação (BOLOTINA et al., 1994). Além

de regular o tônus vascular, o NO modula a adesão leucocitária no endotélio (KUBES et al., 1991), inibe a proliferação celular no músculo liso (GARG e HASSID, 1989; SCOTT-BURDEN et al., 1992) e a agregação plaquetária (RADOMSKI et al., 1987), regula a formação de massa óssea (ARMOUR et al., 2001), o consumo de oxigênio renal (LAYCOCK et al., 1998) e a angiogênese (LEE et al., 1999; ZICHE e MORBIDELLI, 2000).

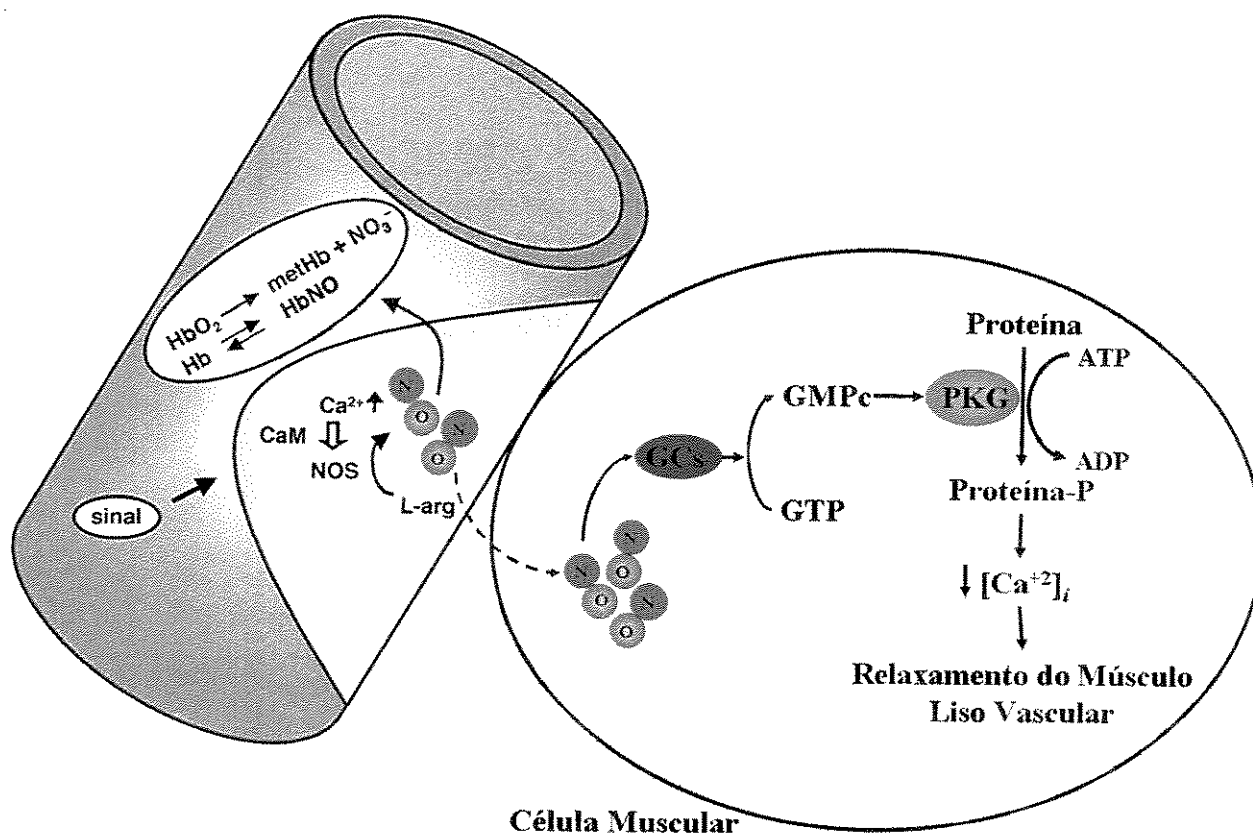


Figura 2. Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular. NO é sintetizado no endotélio vascular, através da ação da NOS que é regulada pela formação do complexo Ca/CaM. A difusão do NO para o tecido muscular ativa GCs e uma vez ativado cataliza a formação de GMPc e cascata de sinalização que resulta em relaxamento do músculo vascular liso (vasodilatação). Modificado de ZHAO et al., 1999.

Além dos efeitos do NO mediados pela formação de GMPc, como o controle do tônus vascular (MONCADA e HIGGS, 1993), o NO exerce diversas outras funções independentes da formação deste nucleotídeo cíclico (PFEILSCHIFTER et al., 2001). Tais funções incluem: 1- modulação da síntese protéica (CURRAN et al., 1991); 2- controle de atividade enzimática (TROY et al., 1996); 3- regulação da expressão (ativação ou repressão) de genes para: **a)** α -actina (KAWADA et al., 1996); **b)** citocinas (REMICK e VILLARETE, 1996); **c)** fatores de crescimento (GUO et al., 1998; TSURUMI et al., 1997); **d)** moléculas de adesão (BIFFL et al., 1996; KUPATT et al., 1997; LEFER e LEFER, 1996); **e)** proteínas envolvidas em apoptose (BRUNE et al., 1998; BRUNE et al., 1998); **f)** receptores (ICHIKI et al., 1998; KEH et al., 1996; MICHELSON et al., 1996; REDMOND et al., 1996; USUI et al., 1998; WALLACE e BOOZE, 1997); **g)** enzimas, tais como a ciclooxigenase-2 (COX-2) (AMIN et al., 1997), citocromo P-450 (KHATSENKO, 1998), metaloproteases de matriz (LALA et al., 1997), superóxido dismutase (BRADY et al., 1997) e a própria NOS (CHEN e MEHTA, 1997).

Alterações atribuídas à atividade ou expressão das NOS e, conseqüentemente, na biodisponibilidade de NO têm sido correlacionadas com processos patológicos como a hipercolesterolemia e aterosclerose (BLAIR et al., 1999; KUHLENCORDT et al., 2001), diabetes (STOCKKLAUSER-FARBER et al., 2000), insuficiência cardíaca (WATANABE et al., 2000), má cicatrização (LEE et al., 1999), hipertensão (PANZA, 1997), hipertensão pulmonar (KANNO et al., 2001; LEE et al., 2001; PEARSON et al., 2001) e miocardiopatia hipertensiva (ARNAL et al., 1993; MORENO et al., 1996). A utilização de análogos da L-arginina em estudos experimentais (MORENO et al., 1996; MORENO et al., 1997; MORENO JUNIOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 1992; ZAPPELLINI et al., 1997) e clínicos (BEDARIDA et al., 1994; DACHMAN et al., 1993), promovendo a inibição da produção de NO, constitui importante ferramenta para o melhor conhecimento da importância fisiopatológica do NO.

1.3. Inibidores da Síntese de Óxido Nítrico

Vários compostos análogos à L-arginina, como a N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA) (REES et al., 1990), a N^ω-amino-arginina (L-NAA) (GROSS et al., 1990), a N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (MOORE et al., 1990) e a N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (MULSCH e BUSSE, 1990) inibem a síntese de NO de forma dose-dependente através da formação de enantiômeros ópticos. Esses compostos são hidrolisados em nitroarginina e competem com a L-arginina pelo sítio enzimático da NOS e conseqüentemente inibindo a formação de NO (PFEIFFER et al., 1996). Embora a L-NIO seja aproximadamente 5 vezes mais potente que os demais inibidores, do ponto de vista qualitativo não há diferenças entre eles quando avaliados os efeitos cardiovasculares. A diversidade de potência desses compostos sobre o tecido vascular *in vitro* e *in vivo* (REES et al., 1990) parece ser devida a diferenças quanto à captação, distribuição e metabolismo dos mesmos (MONCADA et al., 1991).

Comparadas aos demais inibidores, apenas a L-NMMA e a L-NAME são ativas por via oral (GARDINER et al., 1990). L-NAME é uma pró-droga, rapidamente e totalmente, hidrolisada em N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), o inibidor ativo da NOS vivo (AVONTUUR et al., 1998; BROUILLET et al., 1995; MOORE et al., 1990; SCHWARZACHER e RABERGER, 1992; TABRIZI-FARD e FUNG, 1994), que tem uma longa meia-vida plasmática de vinte horas (KREJCY et al., 1993). L-NOARG induz a inibição potente, específica e reversível, da eNOS e nNOS *in vivo* e *in vitro* (GARDINER et al., 1990; MOORE et al., 1991; REES et al., 1990). L-NAME é degradada em L-NOARG por um mecanismo que aparentemente não requer metabolismo por enzimas microsossomais (CYP450), uma vez que essa degradação também ocorre no plasma *in vitro*. Não há outros processos de metabolização pois L-NOARG é o único metabólito detectado na urina. (BROUILLET et al., 1995; TABRIZI-FARD e FUNG, 1994)

1.4. Inibição Crônica da Síntese de Óxido Nítrico

Por motivos éticos, desconhecem-se os efeitos tardios dos inibidores da síntese de NO em humanos. Em ratos, tem sido demonstrado que a inibição crônica da síntese de óxido nítrico pela administração crônica de L-NAME (PALMER et al., 1988; PALMER et al., 1987; REES et al., 1989), por 4-6 semanas é um modelo complexo e bem estabelecido de hipertensão arterial (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992) e miocardiopatia hipertensiva (ARNAL et al., 1993; MORENO JUNIOR et al., 1994; PECHANOVA et al., 1999). É caracterizado por elevação da pressão arterial (PA) de forma severa, progressiva e sustentada (BAYLIS et al., 1992), e pode ser revertida de forma apenas parcial pela infusão de L-arginina. Essa hipertensão apresenta-se associada à redução na frequência cardíaca (FC) (ARNAL et al., 1993; RIBEIRO et al., 1992), no fluxo coronário (MORENO et al., 1997) e débito cardíaco (DC) (AMRANI et al., 1992; JOVER et al., 1993; KASSAB et al., 1998), aumento da resistência vascular periférica total (RVPT) (HERITY et al., 1994; HUANG et al., 1995), diminuição do relaxamento vascular (HOLECYOVA et al., 1996) e alterações na contratilidade cardíaca (LEWIS et al., 1990). Além disso, esse modelo experimental apresenta hipertrofia cardíaca (MORENO et al., 1996), aumento do tamanho cardiomiócito (NUMAGUCHI et al., 1995), remodelamento miocárdico e microvascular com fibrose perivascular (HUANG et al., 1995; LI e SCHIFFRIN, 1994), sendo que o índice peso cardíaco/peso corporal e peso ventricular esquerdo/peso corporal estão usualmente aumentados (BOGER et al., 1994; DELACRETAZ et al., 1994; PECHANOVA e BERNATOVA, 1996). Alterações histológicas consistem em extensas áreas de fibrose e necrose miocárdica, especialmente nas regiões do subendocárdio (MORENO et al., 1996) e aumento de colágeno no coração (PECHANOVA et al., 1997). A concentração do GMPc, segundo mensageiro do NO, apresenta-se reduzida (DENG et al., 1993). A administração crônica de L-

NAME também prejudica a função endotelial e aumenta o dano isquêmico em corações de camundongos com aterosclerose (TOKUNO et al., 2001).

Nos rins, o L-NAME, causa alterações na hemodinâmica renal e função tubular com necrose fibrinóide segmentar nos glomérulos e conseqüente diminuição na filtração glomerular (ADLER et al., 2001; RIBEIRO et al., 1992). Além disso, o tratamento crônico com L-NAME resulta em significativa redução no fluxo sanguíneo periférico no coração, pulmão, fígado, diafragma, músculo esquelético e rins (HUANG et al., 1995).

Além das alterações hemodinâmicas e estruturais, o tratamento de ratos com L-NAME durante duas semanas aumenta a expressão de cininogênio e caliceína em diversos tecidos (cérebro, coração, fígado e rins) (CHAO et al., 1996). De modo similar, o tratamento crônico de cães com L-NNA aumenta a expressão da enzima ciclooxygenase-1 (COX-1) e, conseqüentemente, a produção de prostaglandinas (BEVERELLI et al., 1997). Quanto a receptores, USUI *et al.* (1998) relataram a inibição da síntese de NO pelo L-NAME em ratos, aumentando a expressão de RNAm para receptores do tipo I de angiotensina II (AT_{1A} e AT_{1B}).

As investigações em animais sustentam a hipótese da complexidade deste modelo que envolve diversos processos fisiopatológicos, como a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (RIBEIRO et al., 1992; TAKEMOTO et al., 1997), participação de fatores relacionados ao processo inflamatório (KELM e SCHRADER, 1990; KOYANAGI et al., 2000), regulação da proliferação celular (miócitos, colágeno e fibroblastos) e hipertrofia do miocárdio (MORENO et al., 1995), além dos próprios níveis de pressão arterial elevados que mimetiza, em parte, a miocardiopatia diabética-hipertensiva em ratos (SAMPAIO et al., 2002).

A atividade da renina plasmática encontra-se aumentada durante a administração crônica de L-NAME (RIBEIRO et al., 1992), sugerindo a participação do sistema renina - angiotensina (SRA) neste modelo de hipertensão arterial (HÁ). No entanto, a inibição do SRA através da

administração crônica de enalapril (MORENO et al., 1995), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), ou losartan, antagonista específico para receptores de Angiotensina II, não é acompanhada de normalização completa da PA. Estudos *in vitro*, com arteríolas aferentes (THARAUX et al., 1997) e rim (GARDES et al., 1994), sugerem que o NO estimula a síntese e/ou a secreção de renina. Por outro lado, vários autores relatam um decréscimo de renina circulante (KNOBLICH et al., 1996; RIBEIRO et al., 1992; YAMADA et al., 1996) e um aumento na atividade da ECA em ratos tratados cronicamente com L-NAME (GONZALEZ et al., 2000; TAKEMOTO et al., 1997).

Além do SRA, um aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) após tratamento crônico com L-NAME tem sido descrito (MATSUOKA et al., 1994; ZANCHI et al., 1995), evidenciando seu envolvimento na regulação do tônus vascular neste modelo de HA. De modo complementar, foi observado queda da PA após bloqueio ganglionar e queda na PA e FC após bloqueio de receptores β -adrenérgico (CUNHA et al., 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que a administração de antagonista de AT_1 (candesartan) no trato do núcleo solitário (NTS) produz alterações hemodinâmicas em ratos tratados com L-NAME (ESHIMA et al., 2000).

2. Nucleotídeos Cíclicos

Os nucleotídeos cíclicos, 3',5'guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e 3',5'adenosina monofosfato cíclico (AMPc), são importantes segundos mensageiros, envolvidos na sinalização celular de diversos mecanismos e em diferentes tecidos (BEAVO, 1995). Estão envolvidos nos processos de visão (MCLAUGHLIN et al., 1993), olfato (YAN et al., 1995), agregação plaquetária (DICKINSON et al., 1997), síntese de aldosterona (MACFARLAND et al., 1991), secreção de insulina (ZHAO et al., 1998), relaxamento do músculo liso (BALLARD et al., 1998; BOOLELL et al., 1996), proliferação celular (ABELL et al., 1989; ASSENDER et al., 1992) e controle da função cardíaca (LOHMANN et al., 1991; MOHAN et al., 1995; VILA-PETROFF et al., 1999). As concentrações intracelulares de AMPc e GMPc são controladas pelo equilíbrio entre sua síntese em resposta a sinais extracelulares e sua hidrólise pelas fosfodiesterases. Embora muitos dos efeitos do GMPc e AMPc sejam mediados através da ativação de proteínas *kinases* (PKs) dependentes destes nucleotídeos cíclicos (LINCOLN et al., 1995), diversos outros efeitos já são conhecidos.

As vias de sinalização do AMPc e GMPc são organizadas de uma forma não linear (HUNTER, 2000). A compartimentalização dos diferentes componentes dessas cascatas de sinalização é um importante determinante do resultado do sinal (SCOTT et al., 2000) já que praticamente todos os passos das vias de sinalização destes nucleotídeos cíclicos são controlados por mecanismos de feedback (CONTI et al., 1995). Quando um estímulo extracelular chega à membrana plasmática, ele é transmitido para dentro envolvendo muitos dos sistemas de transdução presentes na célula, e cada componente da cascata é um ponto de conexão entre diferentes vias de sinalização. Sinalização combinada, detecção coincidente, *cross-talk* e condução de sinal são palavras-chaves utilizadas para descrever esta rede de comunicação

intracelular. Neste contexto, algumas etapas nas cascatas de sinalização podem ter funções novas e inesperadas.

2.1. GMPc

O GMPc regula diversas respostas fisiológicas tais como vasodilatação, secreção intestinal e fototransdução retiniana e exerce seus efeitos através da ativação de diferentes efetores, tais como canais iônicos dependentes de GMPc (BIEL et al., 1999), PKs mediadas por GMPc (LOHMANN et al., 1997) e fosfodiesterases (PDEs) (FRANCIS et al., 2001; JUILFS et al., 1999). O início da sua cascata de sinalização pelo GMPc ocorre com a ativação da guanilato ciclase (GC) e conversão de GTP em GMPc. **(Figura 2)** A elevação da concentração de GMPc vai então modular as diversas respostas fisiológicas e/ou patológicas de células e tecidos.

A GC está presente, em diversos tipos de célula e tecido, em duas formas: guanilato ciclase particulada (GC_p) e guanilato ciclase solúvel (GCs) (HARDMAN e SUTHERLAND, 1969; ISHIKAWA et al., 1969; SCHULTZ et al., 1969; WHITE e AURBACH, 1969), que diferem na estrutura e regulação. **(Figura 3)**

A GC_p é uma enzima ligada à membrana celular (MC) e pertence ao grupo das enzimas ligadas a receptores (GARBERS, 1992). Sua estrutura pode ser dividida em três: (1) domínio extracelular amino-terminal que funciona como “receptor”, (2) domínio protéico intracelular “kinase-like” e (3) domínio catalítico COOH-terminal (WEDEL et al., 1995). Já a GCs, ao contrário das enzimas ligadas à proteínas que são estruturas homodímeras, é uma enzima heterodímera, consistindo de: (1) duas subunidades designadas α e β , ambas necessárias para atividade catalítica (KOESLING et al., 1991), (2) domínio *heme*, fundamental para ativação da enzima (IGNARRO et al., 1986) e (3) domínio catalítico COOH-terminal, que apresenta constituição bastante homóloga à da GC_p. O domínio catalítico compreende cerca de 250

aminoácidos responsáveis pela síntese de GMPc (THOMPSON e GARBERS, 1995; THORPE e MORKIN, 1990). (Figura 3)

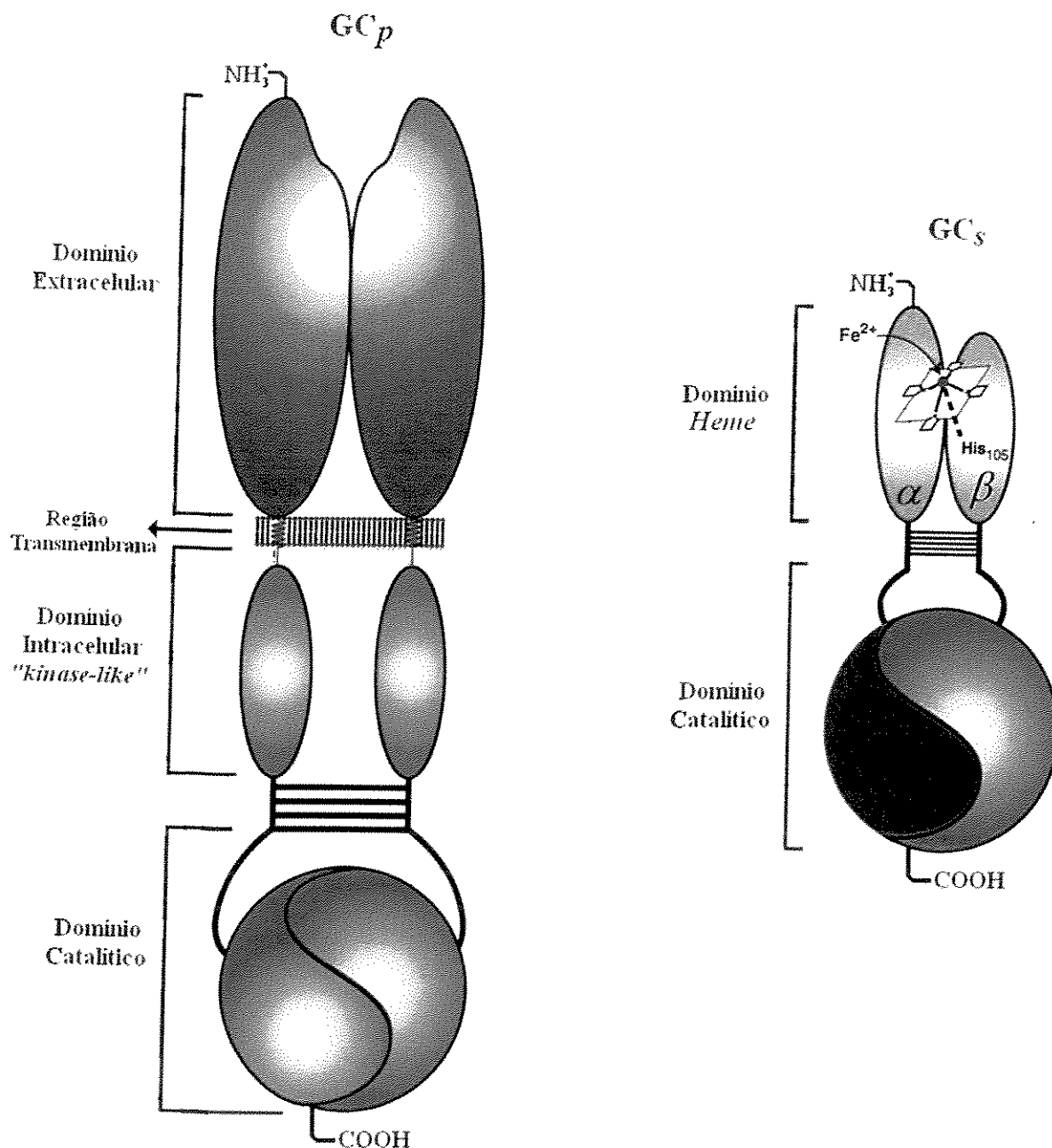


Figura 3. Domínios estruturais das Guanilato Ciclases (GC). A GCp é homodímera e apresenta sítio ligante formado por dois domínios extracelulares amino-terminais. GCs é heterodímera contendo um grupamento heme indispensável a sua ativação. As cores identificam regiões homólogas. Modificado de LUCAS et al. 2000.

A GCs é ativada pela molécula de NO que se liga diretamente ao domínio *heme* formando o complexo NO-Fe⁺²-heme (HILLE et al., 1979). A GCp não responde ao NO por não possuir o domínio *heme* em sua estrutura e este domínio é essencial para ativação da enzima pelo NO (CRAVEN e DERUBERTIS, 1978; IGNARRO, 1990). Desse modo, a GCp é ativada através da ligação de peptídeos específicos ao seu domínio extracelular, tais como peptídeo atrial natriurético (ANP) (CHINKERS e GARBERS, 1989). O ANP é secretado dos miócitos atriais para corrente sanguínea em resposta a distensão ou estiramento da parede dos átrios (RUSKOAHO, 1992). Também é conhecida a atividade do peptídeo cerebral natriurético (BNP) (GARBERS e LOWE, 1994) e peptídeo natriurético tipo C (CNP) (HAMAD et al., 2003) na ativação da GCp e a ordem de potência parece ser ANP ≥ BNP > CNP (HAMAD et al., 2003).

No sistema vascular, em condições fisiológicas, o relaxamento dos vasos, veias e artérias, são mediados pelo GMPc (BOOLELL et al., 1996), através da modulação dos canais de cálcio (WALDMAN e MURAD, 1987), resultando em diminuição da pré- e pós-carga (JACKSON, 2001), sendo que a inibição da sua degradação aumenta o fluxo sanguíneo coronário em corações hipoperfundidos durante isquemia induzida por exercício (RYBALKIN e BORNFELDT, 1999). No coração o GMPc exerce efeitos inotrópicos negativos (SINGH e FLITNEY, 1981; TRAUTWEIN e TRUBE, 1976), reduz o influxo de cálcio (NAWRATH, 1977), encurta a duração do potencial de ação (TRAUTWEIN et al., 1982) e inibe os potenciais de ação dependentes de Ca⁺² (BKAILY e SPERELAKIS, 1985; MEHEGAN et al., 1985; WAHLER e SPERELAKIS, 1985). Também está envolvido na agregação plaquetária (SCHWARZ et al., 2001), regulação de transporte eletrolítico e fluido intestinal (MEZOFF et al., 1992; VAANDRAGER et al., 2000), fototransdução (AMES et al., 1999), controle da secreção de renina (HACKENTHAL et al., 1990; KURTZ e WAGNER, 1998), proliferação celular (ASSENDER et al., 1992; RYBALKIN e BORNFELDT, 1999), síntese de algumas matrizes

extracelular (DEY et al., 1998) e controle do tônus das vias aéreas respiratórias (STUART-SMITH et al., 1998; WARD et al., 1995).

2.2. AMPc

O AMPc, é um segundo mensageiro, descoberto em 1959 e associado à PK dependente de AMPc (PKA) em 1968 (LANGAN, 1968; WALSH et al., 1968), estabelecendo um protótipo para muitas cascatas de sinalização intracelular. Sintetizado a partir da ativação da adenilato ciclase (AC), uma enzima ligada à membrana, que cataliza a conversão do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) em AMPc (TAUSSIG e GILMAN, 1995) Sintetizado a partir da ativação da adenilato ciclase (AC), uma proteína ligada à membrana, que cataliza a conversão do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) em AMPc. A atividade da AC é modulada por duas proteínas G: a Gs, com capacidade de estimular a ativação da adenilciclase, e a Gi, que é capaz de inibir essa ativação. Cada passo da cadeia de reações que é desencadeada pela ativação da proteína G pelo complexo agonista-ligante, constitui um processo de amplificação, em que cada molécula de proteína receptora pode ativar inúmeras moléculas de Proteína G, mas cada uma destas moléculas é capaz de ativar uma molécula de AC. **(Figura 4)**

A AC ativada então, é capaz de catalisar a conversão de um grande número de moléculas de ATP em AMPc, resultando na ativação de diversas moléculas de PKA (SCOTT, 1991), com amplificação do sinal inicial e obtenção de maior resposta celular. Após a ativação da PKA inicia-se uma série de reações enzimáticas levando a uma cascata de fosforilações, ativando múltiplas proteínas que regulam frequência e força da contração cardíaca. Mais recentemente, esta cascata tem-se expandido para incluir várias novas isoformas de AC (SUNAHARA et al., 1996), PDEs (CONTI, 2000), e PKAs (JAHNSEN et al., 1986).

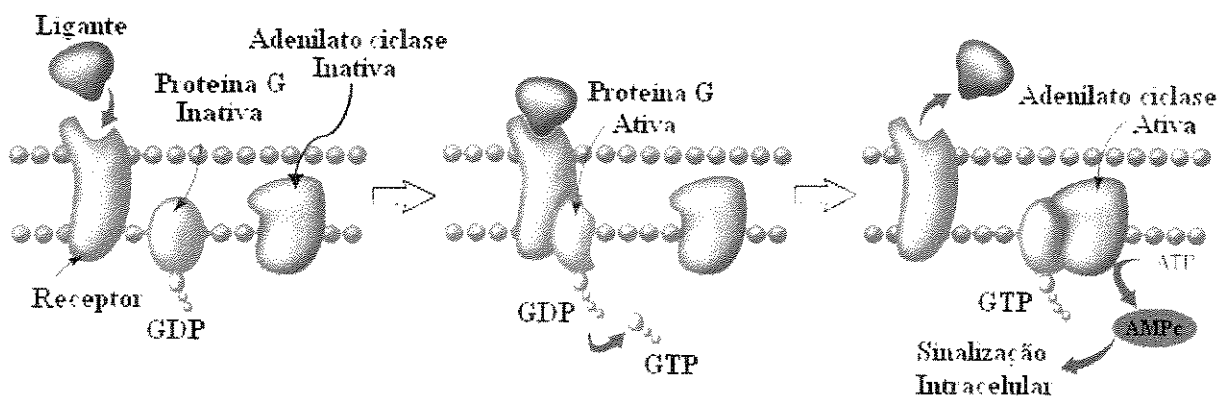


Figura 4. Ativação do AMPc

O AMPc participa ativamente do controle da homeostase do cálcio. No coração, a ativação da proteína Gs e do complexo AMPc/PKA promove fosforilação dos canais de cálcio tipo-L aumentando a entrada de cálcio nos miócitos resultando em um aumento da contratilidade cardíaca (KATZ, 1993). Em condições patológicas, em que ocorre hipertrofia e disfunções cardíacas, já foram identificadas diversas alterações no trânsito de cálcio devido à diminuição dos níveis de proteína Gs, diminuição da atividade da adenilciclase e aumento dos níveis de proteína Gi (BRAUNWALD e BRISTOW, 2000).

3. Fosfodiesterases (PDE)

PDEs foram descritas pela primeira vez por Sutherland e colaboradores (BUTCHER e SUTHERLAND, 1962; RALL e SUTHERLAND, 1958). A superfamília de PDEs é dividida em duas maiores classes, I e II (CHARBONNEAU, 1990), as quais não têm nenhuma similaridade reconhecida. Na classe I estão incluídas todas as PDEs conhecidas e identificadas em mamíferos e compreendem 11 famílias de enzimas (PDE1 – PDE11) que são produtos de genes distintos (BEAVO et al., 1994; BOLGER, 1994; CONTI et al., 1995; DEGERMAN et al., 1997; HOUSLAY, 1995; MICHAELI et al., 1993; SODERLING et al., 1998; SODERLING et al., 1998; THOMPSON et al., 1992; UNDERWOOD et al., 1994). Algumas famílias de PDE são relativamente específicas para AMPc (PDE 4, 7, 8) ou para GMPc (PDEs 5, 6, 9); outras hidrolisam ambos (PDEs 1, 2, 3, 10, 11) (FRANCIS et al., 2001). Todas as PDEs da classe I são diméricas, mas a importância da estrutura dimérica para função de cada uma das PDEs é desconhecida. Todas as PDEs têm um domínio catalítico com aproximadamente 270 aminoácidos, que está localizado na porção carboxi-terminal que regula sua ativação (JIN et al., 1992; SONNENBURG et al., 1995).

Cada família de PDE contém múltiplos genes que amplificam para mais de 50 variantes distintas de isoenzimas (BEAVO, 1995; BEAVO e REIFSNYDER, 1990; CONTI, 2000; CONTI e JIN, 1999; CONTI et al., 1995; FRANCIS et al., 2001; HOUSLAY e ADAMS, 2003; HOUSLAY e KOLCH, 2000; MANGANIELLO e DEGERMAN, 1999; SODERLING e BEAVO, 2000). Além disso, cada família, e os componentes dentro da família, diferem com relação ao padrão distribuição tecidual, celular e subcelular; especificidade de substrato, regulação pelas PKs e proteínas ligantes. E por essa diversidade de isoenzimas e padrão de expressão em diferentes tecidos, as PDEs estão normalmente envolvidas em processos

fisiológicos e patológicos, tais como ereção peniana, asma, hipertensão pulmonar, aterosclerose, insuficiência cardíaca e diabetes. Consequentemente, os inibidores seletivos de PDE são interessantes e promissores alvos farmacológicos. **(Figura 5)**

PDEs catalizam a terminação dos segundos-mensageiros ativos intracelulares por hidrólise da banda fosfodiéster, entre os átomos de P e O na posição 3' com inversão da configuração no átomo de P (BURGERS et al., 1979; GOLDBERG et al., 1980), convertendo AMPc ou GMPc em seus correspondentes monofosfato (AMP ou GMP) (HARDMAN, 1984).

3.1. Fosfodiesterases e o Sistema Cardiovascular

Os cardiomiócitos constituem aproximadamente 60% das células cardíacas e são células diferenciadas que mantêm o ritmo de contratilidade do coração (NADAL-GINARD et al., 2003). Células do endotélio (CE) e do músculo vascular liso (CMVL) constituem a porção das células dos vasos sanguíneos que participam ativamente na regulação da estrutura e função dos vasos (REGAN et al., 2000; THYBERG, 1998). Apesar desses tipos de células serem bastante diferenciados, vários mecanismos de sinalização regulam as ações fisiológicas dos cardiomiócitos, CE e CMVL e a capacidade de cada tipo celular para manter o ritmo fisiológico mesmo em situação de stress cardiovascular.

Apesar dos cardiomiócitos normalmente não sofrerem significantes modulações fenotípicas no adulto, essas células, quando em condições de prolongado stress cardiovascular, como hipertensão ou infarto do miocárdio, podem sofrer um processo de hipertrofia que descompensa suas funções contráteis (REGAN et al., 2000; THYBERG, 1998). Da mesma forma as CE e CMVL, quando em situação de stress prolongado, sofrem alterações hipertróficas que reduzem suas capacidades de responder a variações fisiológicas do sistema cardiovascular. Dessa forma, CE e CVML de artérias saudáveis que teriam a função primária de regular o tônus vascular

pelos mecanismos de contração e relaxamento quando hipertrofiadas perdem essa capacidade (REGAN et al., 2000; THYBERG, 1998). E como tanto o GMPc, quanto o AMPc participam ativamente dos mecanismos de controle relacionados aos cardiomiócitos (inotropismo e cronotropismo), CE (metabolismo, permeabilidade, migração e proliferação celular) e CMVL (mecanismo de contração/relaxamento, proliferação, migração e metabolismo celular (MOVSESIAN, 2000; PANG, 1992; RYBALKIN e BORNFELDT, 1999), é possível que alterações, prévias ou tardias, que modifiquem a atividade, expressão ou local de ação das PDEs nestas células possa alterar significativamente suas ações e funções cardiovasculares.

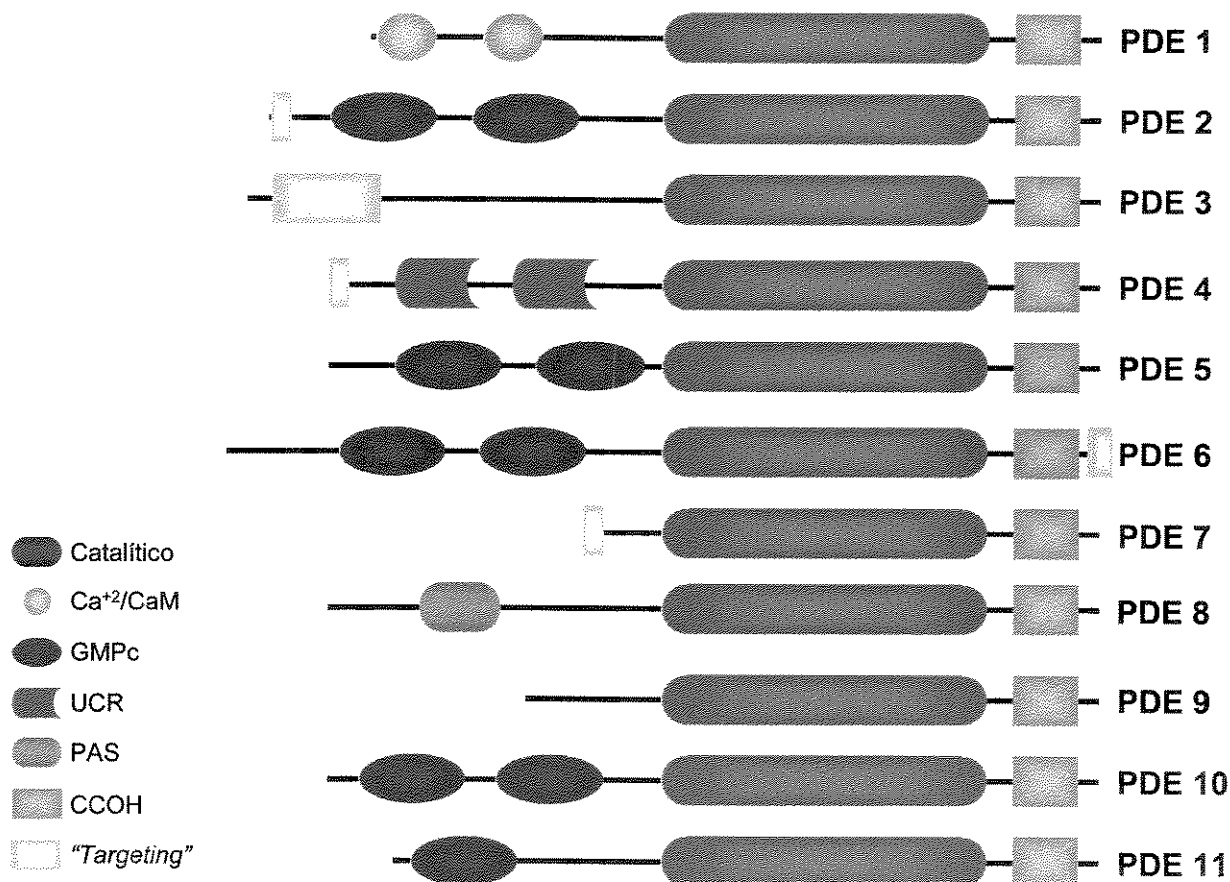


Figura 5. Estrutura Modular das PDEs: Representação esquemática dos domínios nos 11 membros da família de PDEs. Modificado de CONTI, 2000.

Atividade, expressão e local de ação das PDEs têm sido estudados nos miócitos, CE e CVML isolados de diversas espécies, incluindo homem, rato, camundongo, bovinos, suínos e cães. Em modelos de tecido cardíaco, ou cultura de células de miócitos, diversas variantes de PDEs têm sido identificadas (MOVSESIAN, 2000; PANG, 1992), mas embora estudos com tecidos isolados fossem consistentes com a expressão de enzimas das famílias PDE1, PDE2, PDE3, PDE4 e PDE5, dados com culturas de miócitos não foram consistentes com a expressão de PDE1 e PDE5 nessas células, em todas as espécies (MOVSESIAN, 2000; PANG, 1992). Isso pode ocorrer devido às diferenças no padrão de expressão dos genes das PDE em células de diferentes fenótipos (DUNKERLEY et al., 2002; RYBALKIN e BORNFELDT, 1999; RYBALKIN et al., 1997). Mas dada à importância dos cardiomiócitos, CEs e CMVLs no controle do tônus vascular, remodelamento cardíaco e vascular, angiogênese, inotropismo e cronotropismo cardíaco; e a destacada participação do GMPc e AMPc nesses mecanismos, mais análises são necessárias para um maior entendimento deste complexo sistema de sinalização.

3.2.Fosfodiesterase 5

A fosfodiesterase 5 (PDE5) é específica para GMPc (JEREMY et al., 1997; WALLIS et al., 1999) e está presente em grandes concentrações em limitado número de tecidos, tais como: coração, músculo vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, plaquetas e músculo liso visceral (GLOSSMANN et al., 1999). Assim, é importante ressaltar que mesmo em doses terapêuticas (disfunção erétil), a inibição de PDE5 causa aumento de GMPc e efeitos vasculares sistêmicos (WALLIS et al., 1999). A família da PDE5 consiste de um único gene *PDE5* que pode codificar três distintas proteínas (PDE5A1–3) (LOUGHNEY et al., 1998; MCALLISTER-LUCAS et al., 1995) e pouco se sabe sobre os diferentes locais de expressão das variantes da PDE5 e as diferenças de suas ações (FRANCIS et al., 2001; GIORDANO et al., 2001; LOUGHNEY et al.,

1998; MCALLISTER-LUCAS et al., 1995; RYBALKIN et al., 2003; SENZAKI et al., 2001; WALLIS et al., 1999).

Expressão PDE5A1 foi detectada em tecido cardíaco de humanos, ratos e cães, mas há necessidade de evidências mais convincentes pois esse ainda é um assunto controverso (GIORDANO et al., 2001; LOUGHNEY et al., 1998; MCALLISTER-LUCAS et al., 1995; RYBALKIN et al., 2003; SENZAKI et al., 2001; WALLIS et al., 1999). E se PDE5 estiver expressa em cardiomiócitos humanos, há a necessidade de esclarecer qual o impacto de sua inibição por inibidores seletivos de PDE5. Efeitos cardioprotetores com uso do citrato de sildenafil, primeiro inibidor seletivo de PDE5, têm sido descritos em alguns trabalhos experimentais (KUKREJA et al., 2004; OCKAILI et al., 2002; TAKIMOTO et al., 2005), mas os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não foram bem esclarecidos.

A importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada muito claramente por usos clínicos e experimentais do sildenafil (Viagra[®]), no tratamento da disfunção erétil (BALLARD et al., 1998). Além disso, trabalhos recentes têm mostrado o envolvimento da PDE5 na manutenção do tônus (RYBALKIN et al., 2003; STOWE e NOVALIJA, 2000) e remodelamento vascular (KOYAMA et al., 2001; RYBALKIN e BORNFELDT, 1999).

3.3. Inibidores de Fosfodiesterases

Os inibidores das PDEs podem elevar os níveis intracelulares de AMPc, GMPc, ou ambos, dependendo do tipo de fosfodiesterase bloqueada. Esses inibidores mimetizam as estruturas do AMPc e GMPc, que são os substratos naturais para as PDEs. Desta forma, agem por mecanismos de competição (CORBIN e FRANCIS, 1999; CORBIN e FRANCIS, 2002), mas ao contrário do AMPc e GMPc, estes inibidores não são degradados. **(Figura 6)**

Sutherland e Rall (BERTHET et al., 1957), nos anos 50, foram os primeiros a realizar experimentos envolvendo inibidores de PDE, neste caso a cafeína. Desde então se tem sintetizado centenas de inibidores de PDE, mas muitos destes compostos, bem como a cafeína, não são inibidores seletivos. Um importante avanço nas pesquisas em PDE foi a descoberta dos inibidores específicos de PDE, tais como rolipram (inibidor da PDE4) e sildenafil (inibidor da PDE5). Recentemente, tem sido crescente o desenvolvimento de novas drogas inibidoras de PDE5 e as buscas por uma maior seletividade. Tadalafil (Cialis™) e vardenafil (Levitra™) pertencem a nova geração de inibidores específicos da PDE5 e podem inibir essa enzima nos níveis de concentração de nanomolar, porém diferem do sildenafil no seu perfil inibitório com relação às PDEs de outras famílias (EARDLEY e CARTLEDGE, 2002; SAENZ DE TEJADA et al., 2001).

Sildenafil e outros inibidores seletivos de PDE5 potencialmente relaxam o músculo liso do corpo cavernoso e têm sido utilizados com sucesso no tratamento da disfunção erétil (CORBIN e FRANCIS, 2002). Além dessa utilização terapêutica, tem sido reavaliada a utilização de inibidores da PDE5 no tratamento de hipertensão pulmonar, uma patologia com limitadas opções de tratamento e poucos resultados (MICHELAKIS et al., 2002). Por ser via NO-GMPc o controle do tônus vascular pulmonar e a hipertensão pulmonar mostrar reatividade vascular reduzida a vasodilatadores dependentes de NO, foi que se suspeitou que inibidores da PDE5 pudessem ser efetivos nessa patologia (MICHELAKIS et al., 2002; MURRAY et al., 2002).

O sildenafil melhora a responsividade vascular na disfunção endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca (KATZ et al., 2000). Em pacientes com doença cardíaca isquêmica, o sildenafil reduziu a pressão arterial média e pulmonar com leves efeitos na frequência cardíaca e resistência vascular pulmonar e sistêmica sem efeitos no inotropismo cardíaco (GILLIES et al., 2002). Outros estudos hemodinâmicos sugerem que o sildenafil é um vasodilatador moderado com potencial para aumentar o fluxo e a reserva coronária (FELDMAN e MCNAMARA, 2002).

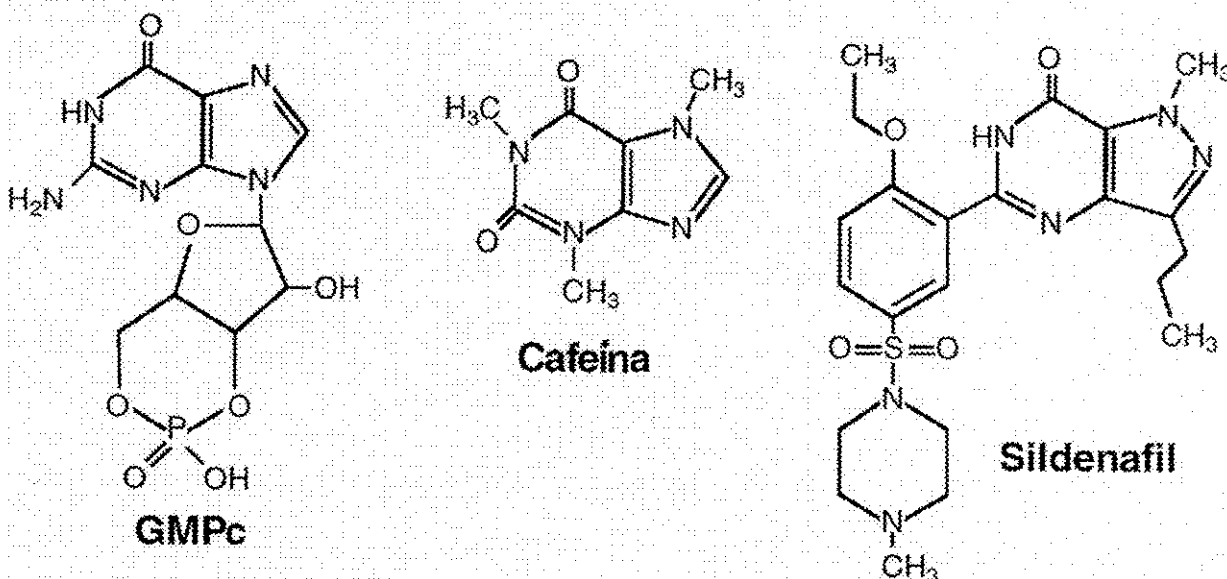


Figura 6. Estruturas comparativas do GMPc (substrato natural das PDEs), Cafeína (inibidor não seletivo de PDE) e Sildenafil (inibidor seletivo da PDE5). A inibição das PDEs ocorre através de mecanismos de competição.

Inibição da PDE5 em cultura de células do músculo liso vascular de artéria coronária mostrou um significativo aumento de GMPc e AMP, atividade da PKA e inibição da proliferação e migração celular (OSINSKI et al., 2001; OSINSKI e SCHROR, 2000). Isso nos exemplifica bem o mecanismo de inibição da PDE3 via GMPc (CREMERS et al., 2003; MOHAN et al., 1995; VILA-PETROFF et al., 1999). Mas inibição da PDE5 interfere no funcionamento das células do músculo liso vascular independente do efeito indireto na PDE3. **(Figura 7)**

A PDE3, pode se diferenciar das outras PDEs por sua alta afinidade tanto pelo AMPc quanto pelo GMPc, com valores de K_m em torno de 0.1-0.8 μM para AMPc, sendo 4-10 vezes mais alto do que para GMPc (BEAVO, 1995; CONTI et al., 1995; DEGERMAN et al., 1997). Dessa forma, AMPc e GMPc são substratos que competem pela PDE3, diferenciando-a da

isoforma PDE4 que também apresenta alta afinidade pelo AMPc, mas não pode ser inibida pelo GMPc (DEGERMAN et al., 1997).

Em humanos, inibidores da fosfodiesterase 3 são utilizados na insuficiência cardíaca terminal e choque cardiogênico por diminuírem a metabolização de AMPc, causando redução da resistência periférica e coronariana, contrapondo os efeitos contrários observados na menor disponibilidade de GMPc observada na cardiopatia por inibição do NO. Os inibidores das fosfodiesterases do tipo específicos para o coração (tipo III) têm um efeito inotrópico positivo. Esta fosfodiesterase é a enzima responsável pela degradação do AMPc intracelular. Os inibidores aumentam a concentração de AMPc da mesma forma que os agonistas dos α -receptores. Os compostos deste grupo incluem a amrinoni e amilrinoni, que são química e farmacologicamente muito semelhantes.

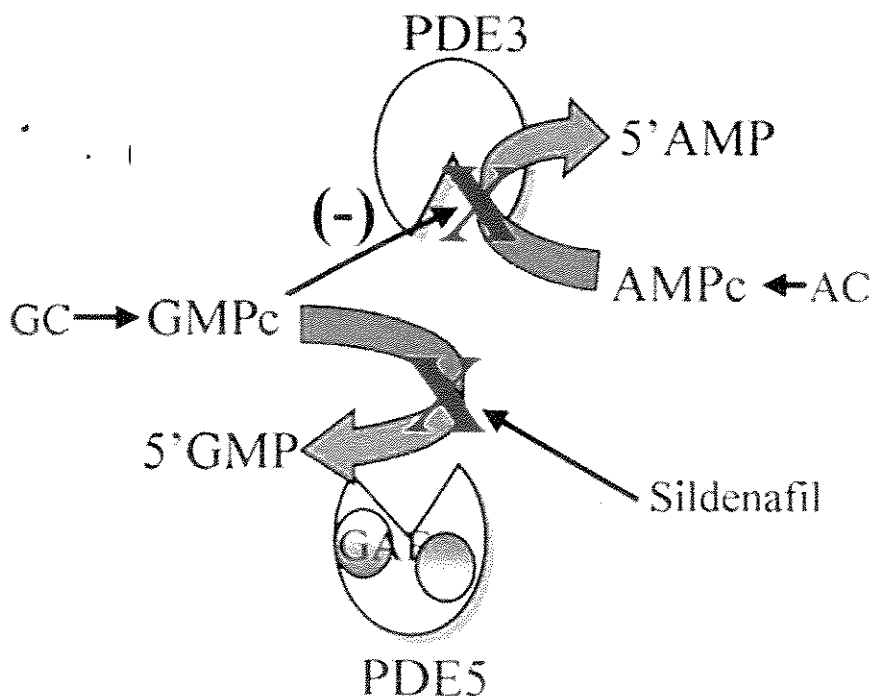


Figura 7. Esquema representativo do “cross-talk” entre a PDE3 e PDE5

As diferentes combinações da expressão de PDE3 e PDE5 nos miócitos e células do músculo vascular liso podem estabelecer a seletividade dos efeitos nessas células ou servir como amplificador de sinais. Em tecidos contendo ambas PDE3 e PDE5, sildenafil pode indiretamente aumentar as concentrações de AMPc através da inibição indireta da PDE3 pelo aumento das concentrações de GMPc (REFFELMANN e KLONER, 2003). **(Figura 7)**

3.4. Disfunção Endotelial e Comprometimento Cardíaco

A disfunção endotelial, definida como a redução na biodisponibilidade de NO, está associada a vários dos fatores de risco das doenças cardiovasculares e disfunção erétil. A ampla utilização de citrato de sildenafil em pacientes com disfunção erétil e doenças cardiovasculares têm resultado em um número considerável de estudos que investigam a segurança cardiovascular e o papel funcional da via óxido nítrico/GMPc/fosfodiesterase-5 no sistema cardiovascular. Além disso, estratégias terapêuticas vêm sendo investigadas com a possibilidade da inibição da PDE5 ser benéfica em patologias como insuficiência cardíaca (SENZAKI et al., 2001), isquemia cardíaca (OCKAILI et al., 2002) e hipertrofia cardíaca (TAKIMOTO et al., 2005).

Em modelos animais, os mecanismos hemodinâmicos envolvidos na resposta à inibição da síntese do NO pela administração aguda da L-NAME têm sido bastante estudados na última década (REES et al., 1989; REES et al., 1990; ZAPPELLINI et al., 1997). Menos estudadas são as alterações cardiovasculares induzidas cronicamente por inibidores de NO. Na década passada, foi descrito um modelo de miocardiopatia em ratos, induzida pela administração oral crônica de L-NAME (MORENO et al., 1996; SAMPAIO et al., 2002), cujas alterações morfológicas e funcionais se superpõem, em alguns aspectos, ao comprometimento do coração na hipertensão arterial grave em humanos. Neste modelo experimental, a administração simultânea de enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, demonstrou que, embora parcialmente eficaz

na prevenção do desenvolvimento de hipertensão arterial e de hipertrofia cardíaca, não previne a instalação de lesões isquêmicas no miocárdio (MORENO et al., 1995). Isto demonstra uma dissociação entre fatores que regulam a liberação de NO em nível sistêmico e miocárdico, bem como sugere a importância do mesmo na auto-regulação coronária. Posteriormente, outro estudo reforçou esta hipótese, demonstrando que a inibição aguda da síntese de NO causa infartos miocárdicos associados à redução de fluxo coronariano (MORENO et al., 1997). Isto, talvez possa ser a base fisiopatológica para uma melhor compreensão de quadros de insuficiências cardíaca e coronariana em humanos.

Estudos recentes têm demonstrado que o sildenafil atua por mecanismos secundários independentes da via NO/GMPc (DISHY et al., 2001; MCAULEY et al., 2001; MOCHIDA et al., 2002) e/ou através da sinalização intracelular (BISCHOFF e SCHNEIDER, 2001) melhorando a disfunção endotelial apresentando efeito cardioprotetor em modelos experimentais de isquemia-reperfusão (OCKAILI et al., 2002). Outros autores têm demonstrado que a síntese aumentada de GMPc intracelular contribui para a redução da responsividade cardíaca simpática (SHAH et al., 1994; VILA-PETROFF et al., 1999), levantando-se a hipótese de que a regulação do GMPc no coração possa potencialmente modular alterações nos estímulos β -adrenérgicos e reduzir a síntese de enzimas por abolir esta via de ativação de mecanismos relacionada à insuficiência cardíaca, contribui para a resposta β -adrenérgica alterada nesta síndrome (SENZAKI et al., 2001).

O sildenafil produz relaxamento de segmentos de artérias coronárias epicárdicas isoladas de cães por causar acúmulo de GMPc (JACKSON, 2001). A droga também tende a aumentar o fluxo sanguíneo miocárdico no exercício e no repouso (TRAVERSE et al., 2000) e não altera a frequência de pico do fluxo coronariano (CHEN et al., 2000). Como um potente e seletivo inibidor específico da guanosina monofosfato, o citrato sildenafil é seguro e eficaz em homens com disfunção erétil de diversas etiologias, incluindo pacientes com doenças cardiovasculares

(CHEITLIN et al., 1999). O fármaco também não causa alterações no fluxo coronariano, mas tem efeito positivo na reserva de fluxo em homens com severa doença arterial coronariana. Junto a estes achados e outros estudos, estes dados sugerem que a fosfodiesterase 5 possa ter importante papel na regulação do fluxo coronariano em indivíduos sadios e portadores de doença cardíaca (JACKSON, 2001). Mas o inibidor da PDE5, sildenafil, largamente utilizado na disfunção erétil em humanos, tem seus efeitos cardiovasculares desconhecidos no modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição crônica da síntese de NO.

A base racional para este projeto é a hipótese de que o sildenafil, por aumentar a disponibilidade de GMPc, possa ter efeitos cardiovasculares benéficos na inibição crônica da síntese de NO que reduz os níveis de GMPc no músculo cardíaco e vascular.

Objetivos

1. Objetivo Geral

Avaliar se a inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5) pelo citrato de sildenafil previne e/ou reverte as alterações cardiovasculares descritas no modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição crônica da síntese de NO em ratos Wistar.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a participação das fosfodiesterases no modelo de inibição crônica da síntese de óxido nítrico através de avaliações hemodinâmicas da pressão arterial, frequência cardíaca e débito cardíaco.
- Estudar os efeitos da inibição crônica da PDE5 nas lesões miocárdicas e remodelamento cardíaco característicos deste modelo experimental.
- Avaliar a expressão das enzimas PDE3 e PDE5 no tecido cardíaco destes animais.

Materiais e Métodos

1. Considerações Gerais

Para o presente estudo foram utilizados ratos machos da cepa Wistar provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 150 e 200 gramas, quando do início do estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade. Os animais receberam água e ração Purina (contendo 2,3 mg de sódio por grama de ração) “*ad libitum*”. Um balanço hídrico diário permitiu a adequação do volume de água a ser ingerido pelos animais em cada gaiola, visando à ingestão total das drogas administradas. O mesmo procedimento foi realizado em relação aos grupos que não receberam drogas. Os experimentos descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEE/IB/UNICAMP) e foram executados em acordo com o NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals e dentro das normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

2. Grupos experimentais

Foram estudados 4 grupos experimentais divididos aleatoriamente em:

CONTROLE: ratos que receberam apenas água fresca;

L-NAME: 20 mg/kg/dia (MORENO et al., 1995) acrescentados a água dos bebedouros;

SILDENAFIL: 45 mg/kg/dia (WALKER et al., 1999) acrescentados à água dos bebedouros;

SILDENAFIL (-24h) + L-NAME: receberam simultaneamente as duas drogas durante o período de 8 semanas, sendo o sildenafil iniciado 24 h antes do L-NAME.

Antes do início do tratamento, a volume médio de ingestão de líquido por caixa com 5 animais/dia foi determinado por meio de um balanço hídrico. Este volume foi utilizado para diluição das drogas e era ajustado no decorrer do tratamento e os bebedouros eram trocados diariamente. Esta metodologia tem sido extensivamente documentada tanto para administração de

L-NAME isoladamente (ARNAL et al., 1993; ARNAL et al., 1992; BERNATOVA et al., 1999; MORENO et al., 1996; MORENO et al., 1997) quanto para co-administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (BERNATOVA et al., 1999; MORENO et al., 1995; RHALEB et al., 1994), bloqueadores de canais de cálcio (DE OLIVEIRA et al., 1999) e β -bloqueadores (PACCA et al., 2002).

Após 8 semanas, os animais foram tiveram seus parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos avaliados conforme metodologia descrita a seguir.

3. Avaliação do peso corporal e da pressão arterial de cauda

Previamente ao estudo, e durante 8 semanas após o início do mesmo, os animais foram pesados duas vezes por semana, utilizando-se uma balança para pequenos animais (Balança para Pequenos Animais, Harvard Apparatus, Inc., MA, USA). Nos mesmos dias, a pressão arterial de cauda foi avaliada, utilizando-se um manguito colocado em torno da cauda do animal o qual era conectado a um sensor (Sistema Indireto de Medida de Pressão Arterial; Harvard Apparatus, Inc., MA, USA) (STEWART et al., 1993). Os valores médios das duas medidas semanais do peso corporal e da pressão arterial de cauda foram utilizados como representativos de cada semana.

4. Avaliações Hemodinâmicas

4.1. Avaliação da pressão arterial média (PAM)

Ao final do tratamento de 8 semanas os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com pentobarbital sódico (80mg/kg) e submetidos à cateterização da artéria carótida para registro direto da pressão arterial e da veia femoral para injeção de drogas e manutenção de anestesia, quando necessária. Os animais também foram entubados com cânula endotraqueal para assistência ventilatória. A cânula era conectada a um respirador (Pressure Controlled Ventilador

Kent Scientific 325 Norfolk RD – Litchfield CT 06759 – USA) e durante a cirurgia os animais foram mantidos com volume corrente de 2,5ml de O₂ e frequência respiratória de aproximadamente 56 movimentos por minuto.

Os cateteres arteriais e venosos foram mantidos patentes com solução de heparina. A pressão arterial média (PAM) foi monitorada por meio de transdutor de pressão previamente calibrado. O sinal da PAM foi amplificado, e processado por uma placa analógico-digital conectada a um computador. Os registros foram analisados pelo programa WINDAQ (DATAQ Instruments Windaq, Version 1.78, Akron, OH, EUA) e Advanced Codas (DATAQ Instruments, Calc Package, Version 3.19, EUA). (**Figura 8**)

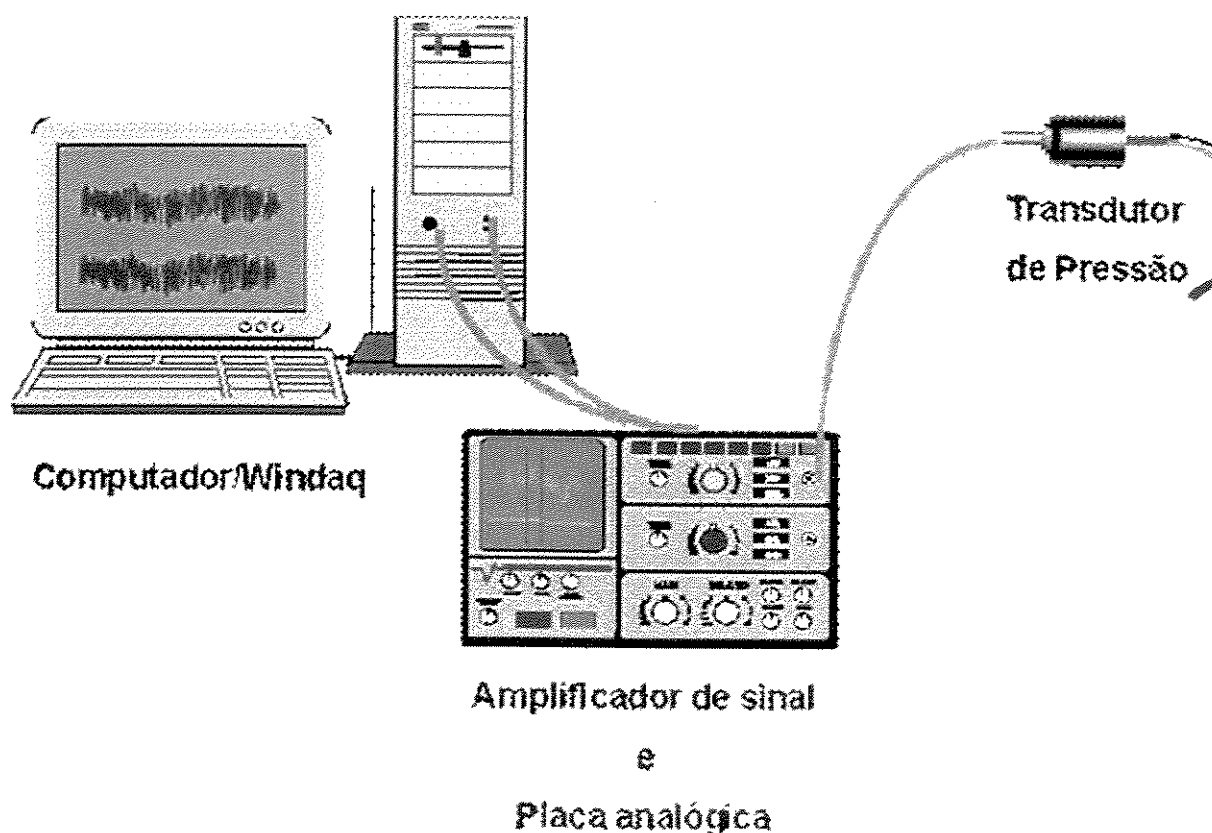


Figura 8. Esquema da aquisição de dados da PAM por meio de uma interface analógico-digital.

O programa WINDAQ permite a análise dos pulsos de pressão batimento-a-batimento, para obtenção de valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e FC. A PAM foi obtida a partir da integração dos valores de pressão entre duas detecções consecutivas da pressão diastólica. (IRIGOYEN et al., 1991)

4.2. Fluxo Aórtico

Após registro direto de 15 minutos de pressão arterial sistêmica nos animais descritos anteriormente (item 4.1), realizávamos a medição do fluxo sanguíneo na raiz da aorta, como estimativa do débito cardíaco (DC, ml/g/min). Para essa técnica utilizamos sondas ultrassônicas (Transonic® Flowprobe – Transonic Systems Inc. NY, EUA) que são constituídas por uma placa acústica refletora em formato de gancho (**Figura 9A**), com um dispositivo que permite a abertura e o fechamento, possibilitando o envolvimento do vaso sanguíneo.

Para esta técnica implantamos uma sonda na artéria aorta ascendente, através de uma incisão na altura do terceiro espaço intercostal direito, através da qual era possível acessar a cavidade torácica. A aorta ascendente era dissecada e isolada e a sonda ultrassônica devidamente posicionada (**Figura 9B e C**). Após a colocação da sonda a incisão da pele era suturada com fio de algodão. (**Figura 9D**)

Os registros de fluxo aórtico (**Figura 10**) foram monitorados e gravados durante 15 minutos após estabilização dos mesmos. Para análise destes registros foi feita utilizando-se os mesmos programas descritos para a análise da PAM.

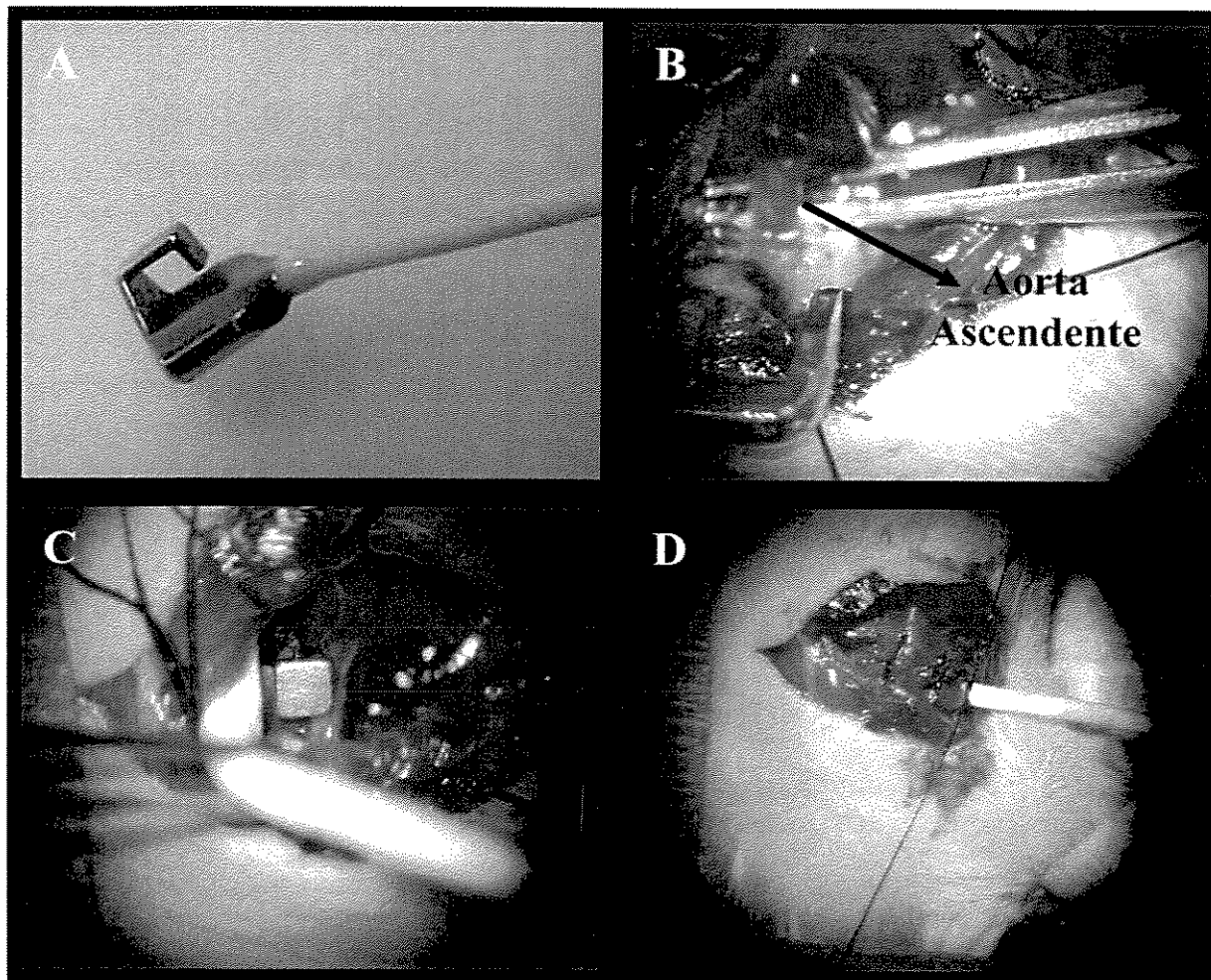


Figura 9. Técnica de determinação do fluxo aórtico. Probe do fluxômetro implantado ao redor da artéria aorta ascendente. (A). A aorta era isolada da artéria pulmonar e cuidadosamente separada através de pinças cirúrgicas (B) para imediatamente ser delicadamente inserida abertura do probe do fluxômetro. Confirmávamos que o vaso estava totalmente envolvido através de suave rotação do probe (C). O cabo era posicionado lateralmente e a toracotomia fechada sobre o probe (D).

4.3. Resistência Vascular Periférica Total (RVPT)

A RVPT (mmHg/ml/g/min) foi estimada através do cálculo da razão entre a PAM (mmHg), medida diretamente através da canulação da artéria carótida, e o DC (ml/g/min), obtido diretamente da medida do fluxo da artéria aorta ascendente. ($RVPT = PAM/DC$).

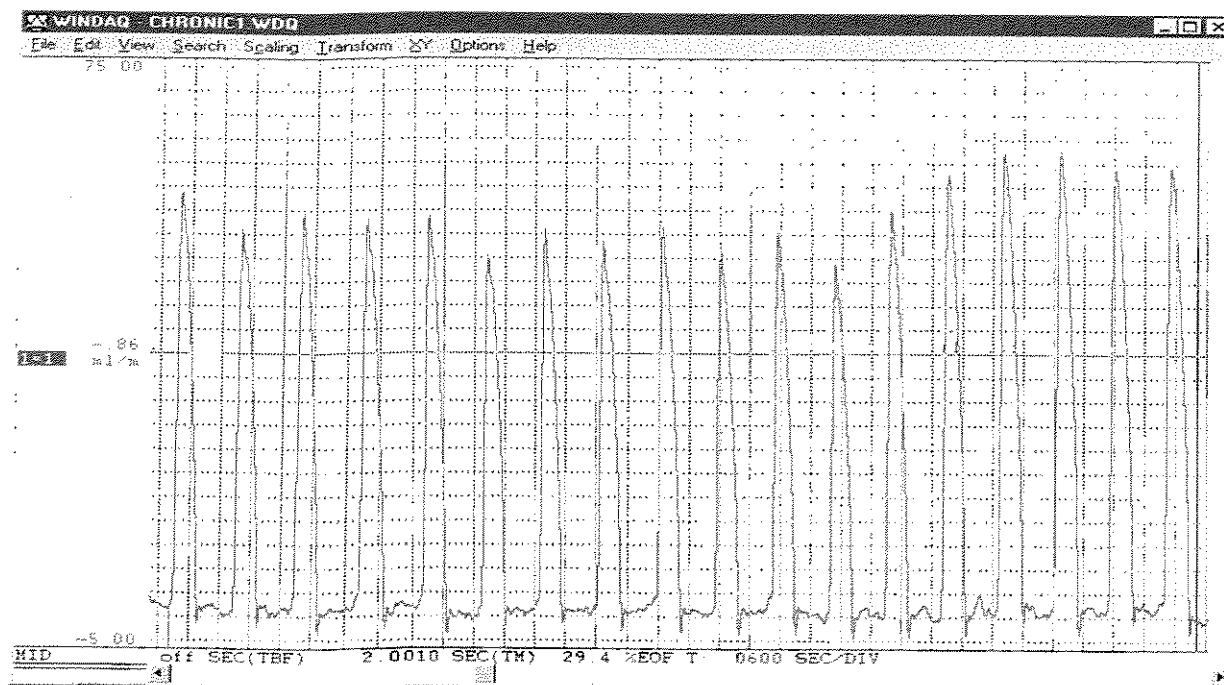


Figura 10. O registro representativo do fluxo aórtico através da implantação de um transdutor na artéria aorta ascendente em ratos Wistar

5. Avaliações Histológicas

5.1. Coleta e processamento dos tecidos

Ao final dos tratamentos, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico (pentobarbital sódico 100mg/kg) intraperitoneal. Ao mesmo tempo, também foi aplicada heparina sódica (50U). A perfusão foi realizada através de punção do ventrículo esquerdo. Inicialmente, foi feita a perfusão com solução salina 0,9% durante 10 minutos para lavagem adequada do sangue contido nos vasos. Após, o animal foi perfundido com formol tamponado 4% durante 15 minutos,

para fixação completa dos tecidos. Procurou-se manter a pressão de perfusão entre 80 e 100 mmHg. Isso é importante para garantir que as artérias fixem com estiramento próximo do fisiológico.

Em seguida à determinação dos pesos cardíacos, os ventrículos esquerdos foram cortados perpendicularmente ao seu maior eixo em 5 anéis equidistante e deixados em formol tamponado por um período aproximado de 24 horas.

Após o período de fixação, os tecidos são retirados e são dispostos em cassetes de plástico para processamento/inclusão, sendo os cassetes processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 horas (realizando desidratação, diafanização e parafinização do material). Os tecidos processados serão incluídos em parafina utilizando uma central de inclusão, levados a micrótomo e cortados em 3 μ m de espessura.

5.2. Determinação da massa miocárdica

Após a perfusão o coração foi removido do tórax e dissecado, sendo os átrios dissecados os ventrículos pesados em uma balança analítica Mettler (Instrument Corp Highstone N.J., USA) obtendo-se, assim, o peso cardíaco total (PCt, g). Em seguida, o peso ventricular esquerdo (PVE g) foi determinado extirpando-se a parede livre do ventrículo direito e pesando-se o tecido restante (ventrículo esquerdo e septo interventricular). Os pesos do coração e do ventrículo esquerdos foram corrigidos para o peso corporal de cada animal ao final do estudo, obtendo-se assim, respectivamente, o índice do peso cardíaco total (IPCt, mg/g) e o índice do peso ventricular esquerdo (IPVE, mg/g) (MORENO et al., 1996).

Em seguida os tecidos foram deixados em formol tamponado por um período aproximado de 24 horas, dando continuidade ao processo de preparação dos tecidos para análise morfológica ou imunohistológica.

5.3. Avaliações Morfométricas

Após o corte dos tecidos e as lâminas foram coradas com Tricrômio de Masson e os parâmetros a seguir analisados por microscopia óptica. Foram analisados 5 cortes de cada animal.

5.3.1. Diâmetro de Miócito

O diâmetro dos cardiomiócitos foi determinado pela medida dos diâmetros das células em cada um dos animais dos diferentes grupos experimentais.. Foi utilizada uma ocular (10x) contendo uma escala graduada (micrômetro ocular) (Microscopy Zeiss, Model Axioskop 2 FS plus, Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Germany) e objetiva de imersão de 100x, portanto, com um aumento final de 1000x. Com esse sistema efetuou-se a medição do diâmetro de 15 miócitos de cada uma das três regiões distintas do ventrículo esquerdo (subendocárdica, médio-miocárdica e subepicárdica).

5.3.2. Lesões Miocárdicas

As lesões miocárdicas resultantes de infartos, mostrando morte de cardiomiócitos e/ou à presença de fibrose, foram estudadas através de microscopia ótica (Microscópio Zeiss, modelo Axioscop 20, Germany) usando-se a análise estereológica (AHERNE, 1970). O volume relativo ocupado por cada elemento do ventrículo esquerdo (fibras miocárdicas, tecido conjuntivo e vasos) foi medido com uma ocular especial contendo um retículo de 25 pontos (5 linhas paralelas com 5 pontos cada, kpl 8x, Zeiss, Germany). Para contagem, 50 campos microscópicos serão avaliados e o volume relativo (Ppi) ocupado por cada componente será determinado como se segue:

$$P_{pi} = p/P - R,$$

onde p é o número de pontos do retículo que se superpõe a cada componente do coração, P é o número total de pontos do retículo e R é o número de pontos do retículo considerados como áreas de artefato técnico (refração).

O resultado dessa análise foi expresso como percentual da área de tecido total ocupado pelas lesões cardíacas (COELHO-FILHO et al., 2001; RUSS e DEHOFF, 2000; SAMPAIO et al., 2002; WEIBEL, 1979).

5.3.3. Espessura da Camada Média Vascular

Para determinar as alterações na espessura da camada média vascular (CMV) foram analisadas as artérias com diâmetro externo (DE) $\leq 100 \mu\text{m}$.

Medidas morfométricas foram realizadas com um sistema ótico eletrônico de análise de imagem (Kontron 300, UK). A espessura da CMV das artérias do tecido cardíaco foi calculada através da medida dos seguintes parâmetros: **1.** Diâmetro externo (DE) – diâmetro entre as lamina elásticas externas; e **2.** Diâmetro interno (DI) – diâmetro entre as camadas elásticas internas. A partir dessas medidas utilizamos a seguinte fórmula:

$$\text{CMV} = [(DE-DI)/2]/DE$$

Os valores obtidos da CMV foram expressos em (μm). Foi utilizada uma ocular (40x) contendo uma escala graduada (micrômetro ocular) (Microscopy Zeiss, Model Axioskop 2 FS plus, Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Germany). E com esse sistema efetuou-se a medição do diâmetro de 15 artérias por lâmina.

5.4. Imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais com o solvente Citrisolv[®] (substituto do Xilol). Antes da hidratação dos tecidos, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio e metanol (1:9) por 20 minutos. Após a hidratação, os tecidos foram lavados em PBS 1X. Previamente à aplicação do anticorpo primário, para evitar a marcação inespecífica, foi feito o bloqueio dos epitopos através da incubação em soro fetal bovino (FBS 10% em PBS 1X; 60' em temperatura ambiente) seguido por bloqueio em molico 2,5% (em PBS 1X; 30' em temperatura ambiente).

Os anticorpos primários usados foram diluídos em solução de BSA 2% em PBS 1X como apresentado na tabela 1. As lâminas foram incubadas a 40C por 16 a 18 horas. Após este período, foram lavadas e incubadas (60' em temperatura ambiente) com seus respectivos anticorpos secundários (diluídos 1:1000 em PBS 1X). Como estes anticorpos secundários usados são biotinilados, foi feita nova incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (1:1000). Esta incubação procedeu-se por mais 60' em temperatura ambiente.

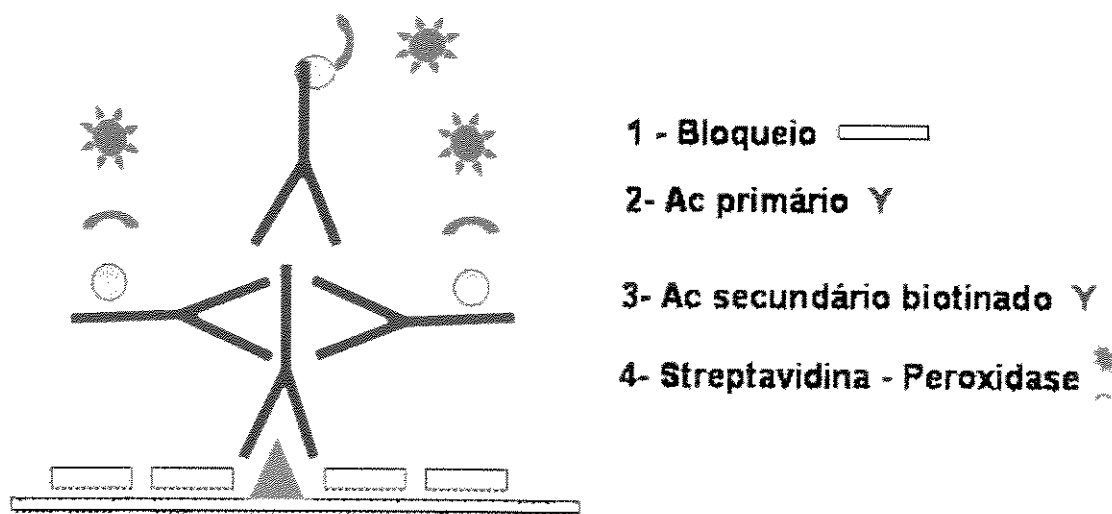
Ao final da sequência de incubações, as lâminas foram lavadas e foi feita a revelação da marcação dos anticorpos pela reação da peroxidase conjugada com o cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB). A solução cromógena usada foi composta por DAB (6 mg), peróxido de hidrogênio (150 µl) e PBS 1X (10 ml), sempre protegidos da luz. A reação foi feita no escuro e em temperatura ambiente durante 2', sendo as lâminas imediatamente lavadas.

Foi feita contra-coloração com hematoxilina (por 30'') e a seguir as lâminas foram desidratadas e montadas. A figura 11 resume a forma de marcação e revelação da presença da proteína de interesse com o uso de anticorpos específicos.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica.

Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Fabricante	Concentração
Ig G Anti-NOS2 (anti-coelho)	(IgG anti-coelho)	Zymed	1: 500
IgG Anti-NOS3 (anti-coelho)	(IgG anti-coelho)	Zymed	1: 500
IgG Anti-PDE3 (anti-cabra)	(IgG anti-cabra)	Zymed	1: 300
IgG Anti-PDE5 (anti-coelho)	(IgG anti-coelho)	Zymed	1: 250

A marcação nos permitiu obter uma boa noção da morfologia celular. Os sinais positivos foram visualizados por microscopia óptica. Na ausência de anticorpos primários (anti-NOS1 e anti-NOS3), o uso de anticorpos secundários (controle negativo) não produziu marcação significativa.

**Figura 11.** Esquema da técnica de imunohistoquímica

As lâminas foram codificadas e avaliadas por dois observadores independentes, em microscópio óptico (Q500YW - LEICA, UK), com aumento de 40x, acoplado a analisador de

imagem (Quantimet Q500YW - LEICA, UK). Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa de todas as lâminas e depois análises quantitativas ou semi-quantitativas (sistema de cruzes) dos parâmetros que se demonstraram alterados.

5.4.1. Análises quantitativas

Intensidade de marcação das imunohistoquímicas foram diretamente medidas utilizando-se um analisador de imagem (Quantimet Q500YW - LEICA, UK) de alta resolução. Parâmetros relacionados com a intensidade de luz e cor da marcação foram previamente calibrados (GATON et al., 1999; SAGARA et al., 1999). Os valores obtidos foram expressos em unidade arbitrária (UA).

PDE5 – Camada Média Vascular - A intensidade de marcação (IM) foi calculada através da análise de 10 artérias com DE menor de 50 μm . (arteríolas) e 10 artérias com DE maior que 50 μm . Esses valores foram obtidos subtraindo-se da área total (AT) da camada média vascular do vaso a área marcada (AM) pela reação de imunohistoquímica. ($\text{IM} = \text{AT} - \text{AM}$)

PDE5 – Discos intercalares - Foram analisados 10 campos do tecido cardíaco, nos quais foi medida a intensidade de marcação de 10 discos intercalares escolhidos aleatoriamente e calculada uma média por campo. A IM de cada disco foi calculada através da medida da área utilizando-se um analisador de imagem. (**Figura 12**)

PDE3 – Camada Adventícia Vascular - Foi utilizada a mesma técnica utilizada para quantificar as marcações da PDE5 na CMV descritas acima. ($\text{IM} = \text{AT} - \text{AM}$)

5.4.2. Análises semi-quantitativas

A expressão da eNOS e iNOS no tecido cardíaco foi analisada através do sistema de cruzes, padronizados da seguinte maneira:

- 0 Sem marcação
- + Marcação leve
- ++ Marcação moderada
- +++ Marcação intensa



Figura 12. Foto representativa do cálculo da Intensidade de Marcação (IM) da reação de imunohistoquímica para PDE5 discos intercalares do miocárdio. As áreas circuladas em vermelho representam a área dos discos intercalares a ser calculada pelo analisador de imagens e correlacionada com a IM.

6. GMP cíclico

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos de ensaio contendo EDTA para determinar os níveis plasmáticos de GMP cíclico, usando-se “kit” comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA, Cayman chemical Co.).

7. Análise estatística

Para a análise dos resultados foram utilizadas análises de variância (ANOVA) para medidas repetidas e quando os resultados da ANOVA foram significantes, utilizamos o teste de Bonferroni para analisar as diferenças entre os grupos.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Consideramos como diferenças estatísticas significativas, valores de $P < 0,05$.

Resultados

1. Avaliação do Peso corporal (PC) e da pressão arterial de cauda (PAC)

Após 8 semanas de tratamento não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no ganho de peso dos animais dos grupos Controle, L-NAME, Sildenafil+ L-NAME e Sildenafil. (Tabela 2)

A administração de L-NAME causou aumento crescente e significativo na PAC nos ratos dos grupos L-NAME e L-NAME + Sildenafil quando comparados aos do grupo Controle a partir da 2^a. de estudo. A partir da 6^a. semana, a PAC do grupo L-NAME continuou a aumentar progressivamente, mas administração de citrato de sildenafil simultaneamente ao L-NAME impediu, a partir da 6^a. semana, a elevação progressiva da PAC no grupo L-NAME + Sildenafil, mostrando valores significativamente reduzidos se comparados ao grupo L-NAME. (Figura 13)

Tabela 2. Peso corporal (PC), Peso cardíaco total (PCt), Índice do peso cardíaco total (IPCt), Peso do ventrículo esquerdo (PVE), Índice do peso do ventrículo esquerdo (IPVE), e Diâmetro de miócito do ventrículo esquerdo (DM) nos grupos experimentais após oito semanas. Os valores estão representados como média $\pm$ SEM.

	Controle	Sildenafil	L-NAME	L-NAME + Sildenafil
PC (g)	379 $\pm$ 11	378 $\pm$ 7.4	343 $\pm$ 11	355 $\pm$ 7.4
PCt (mg)	1046 $\pm$ 45	993 $\pm$ 38	1107 $\pm$ 60	1072 $\pm$ 43
IPCt (mg/g)	2.7 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1 *	2.9 $\pm$ 0.1 [#]
PVE (mg)	682 $\pm$ 28	656 $\pm$ 25	810 $\pm$ 17 *	700 $\pm$ 7 [#]
IPVE (mg/g)	1.8 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.3 *	1.9 $\pm$ 0.2 [#]
DM, (μm)	14.0 $\pm$ 1.2	13.6 $\pm$ 0.4	22.8 $\pm$ 1.7 *	19.8 $\pm$ 1.7 * [#]

* $P < 0.05$ vs Controle; [#] $P < 0.05$ vs L-NAME.

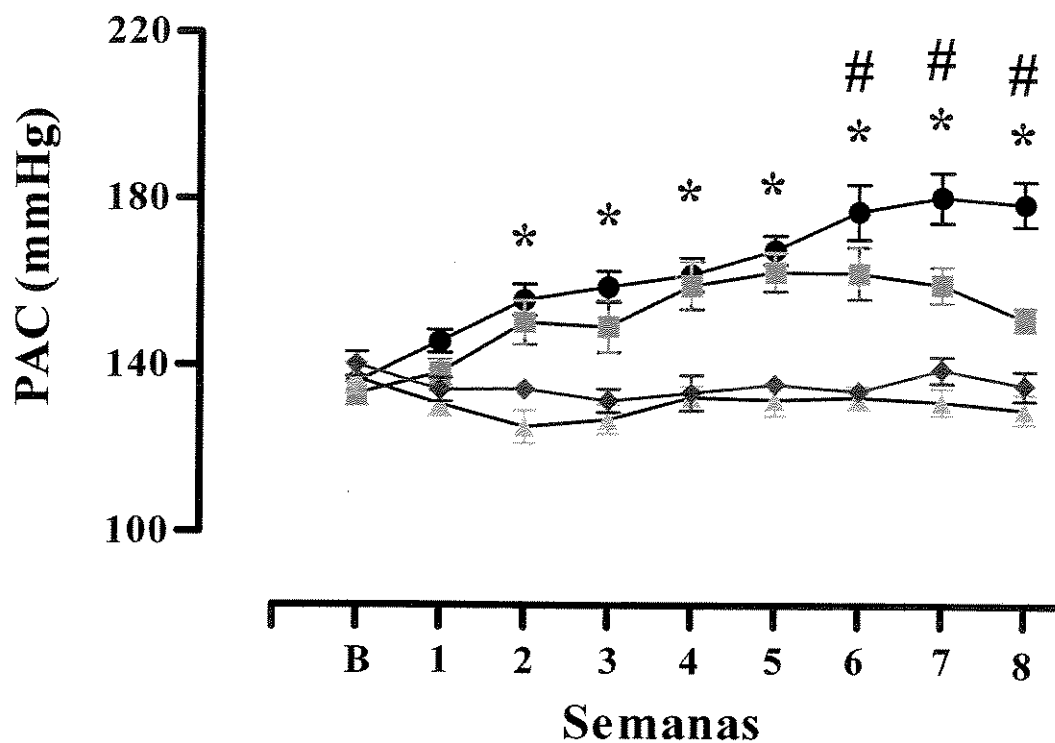


Figura 13. Alterações na pressão arterial de cauda (PAC, mmHg) durante as 8 semanas do estudo. - Controle (n=15); ♦ - Sildenafil (n=15) e ■ - L-NAME (n=15) e ● - L-NAME + Sildenafil (n=15). Os pontos representam média $\pm$ EPM de 15 ratos. * $P < 0.05$ vs grupo Controle. # $P < 0.05$ vs grupo L-NAME.

2. Avaliações Hemodinâmicas

2.1. Pressão arterial média (PAM)

A administração crônica de L-NAME induziu aumento significativo da pressão arterial média (PAM, mmHg) nos ratos dos grupos L-NAME ($184,1 \pm 15,3$ mmHg) e L-NAME + Sildenafil ($157,9 \pm 11,9$ mmHg) quando comparados ao grupo Controle ($114,4 \pm 16,7$ mmHg). A PAM dos animais do grupo Sildenafil ($121,2 \pm 19,1$ mmHg) não diferiu significativamente do grupo Controle. A PAM dos animais do grupo L-NAME mostrou-se mais elevada que nos animais do grupo L-NAME + Sildenafil. (Figura 14)

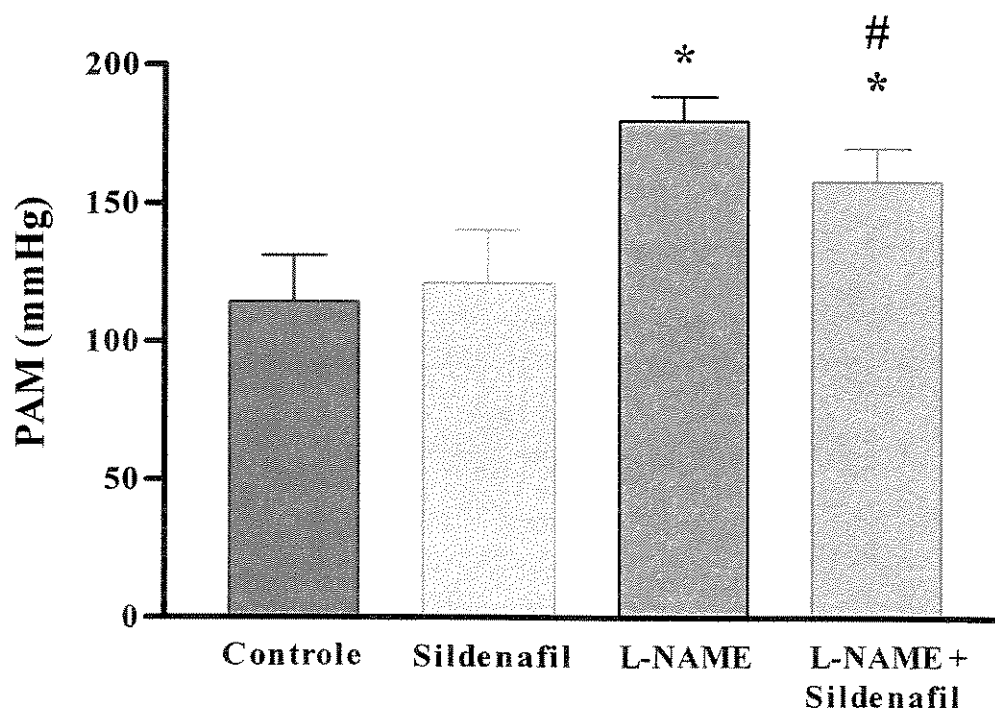


Figura 14. Valores de pressão arterial média (PAM) obtida por canulação da artéria carótida nos grupos Controle, L-NAME, Sildenafil e L-NAME + Sildenafil, expressos em mmHg, sob a forma de $\bar{x} \pm DP$. * $P < 0,05$ vs. Controle. # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

2.2. Fluxo Aórtico

O fluxo aórtico foi medido diretamente na raiz da aorta como representativo do débito cardíaco (DC, ml/min) (Figura 13). Na apresentação de nossos resultados, utilizamos o índice cardíaco (IC, ml/min/g), obtido pela divisão do DC pelo peso corporal de cada animal. A administração crônica de L-NAME causou redução significativa do DC nos ratos dos grupos L-NAME quando comparados com o grupo Controle (0.084 ± 0.014 ml/min/g vs. 0.137 ± 0.032 ml/min/g, respectivamente). A administração concomitante de citrato de sildenafil aumentou o IC quando comparado ao grupo de animais que recebeu L-NAME isoladamente (0.128 ± 0.014 ml/min/g vs. 0.084 ± 0.014 ml/min/g, respectivamente), embora ainda reduzido em relação ao grupo Controle (0.117 ± 0.014 ml/min/g vs. 0.137 ± 0.032 ml/min/g, respectivamente). O IC dos animais do grupo Sildenafil não diferiu do grupo Controle. (Figura 15)

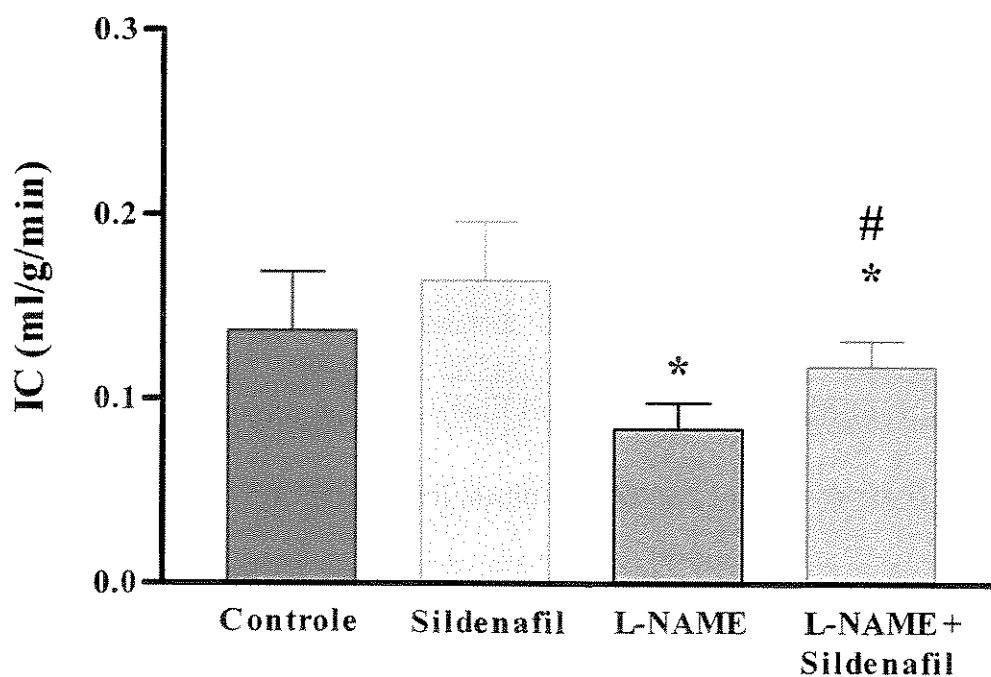


Figura 15. Débito cardíaco estimado (IC) nos grupos Controle; L-NAME; Sildenafil e L-NAME + Sildenafil. Os valores estão expressos em ml/g de peso/minuto (ml/g/min) ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle; # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

2.3. Resistência Vascular Periférica Total (RVPT)

Os resultados indiretamente obtidos demonstraram aumento significativo na RVPT (mmHg/ml/min) nos grupos L-NAME e L-NAME + Sildenafil quando comparados ao grupo Controle. Nos animais que receberam citrato de sildenafil e L-NAME concomitantemente também se verificou diferença significativa nos valores de RVPT. Não observamos alterações de RVPT no grupo Sildenafil. (Figura 16)

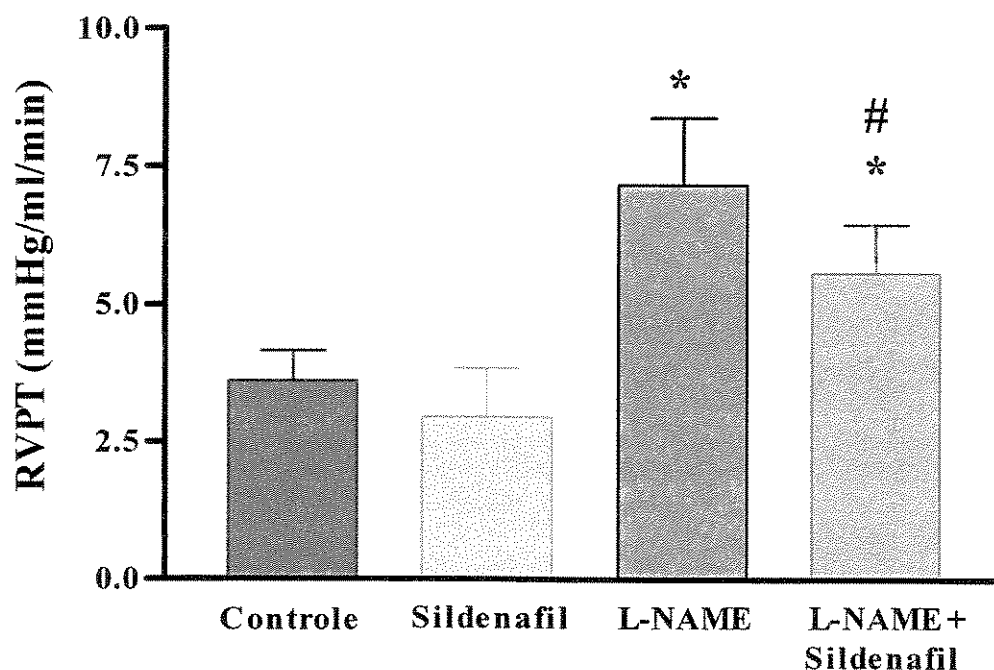


Figura 16. Avaliação indireta da resistência vascular periférica total (RVPT; mmHg/ml/min) nos grupos Controle; L-NAME; Sildenafil e Sildenafil+L-NAME. Os valores estão expressos em mmHg/ml/min ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle; # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

3. Avaliações Histológicas

3.1. Determinação da massa miocárdica

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais Controle, L-NAME, L-NAME + Sildenafil e Sildenafil quando avaliamos o peso cardíaco total (PCt). O grupo L-NAME apresentou aumento significativo no IPCt, PVE e IPVE quando comparados ao grupo Controle. O grupo que recebeu sildenafil e L-NAME, simultaneamente, mostrou significativa redução no IPCt, PVE e IPVE quando comparado ao grupo L-NAME (L), embora sem prevenção total desses parâmetros. A administração Sildenafil, isoladamente, não alterou esses parâmetros. **(Tabela 2)**

3.2. Avaliações Morfométricas

3.2.1. Diâmetro de Miócito

O diâmetro dos miócitos (DM, μm) no grupo Sildenafil foi similar aos dos animais do grupo Controle. Ao contrário, o diâmetro dos cardiomiócitos nos grupos L-NAME e L-NAME + Sildenafil estavam aumentados significativamente quando comparados ao grupo Controle ($P < 0.05$ para ambos). Sildenafil atenuou significativamente a hipertrofia dos cardiomiócitos causada pela administração do L-NAME ($P < 0.05$). **(Tabela 2)**

3.2.2. Áreas de Lesão

As áreas de fibrose miocárdica (AF, %) do grupo L-NAME foram significativamente mais extensas quando comparadas às dos animais do grupo Controle. O grupo que recebeu sildenafil e L-NAME mostrou significativa redução da fibrose miocárdica quando comparado ao grupo L-NAME, embora sem prevenção total desse achado histopatológico. **(Figura 17 e 18)**

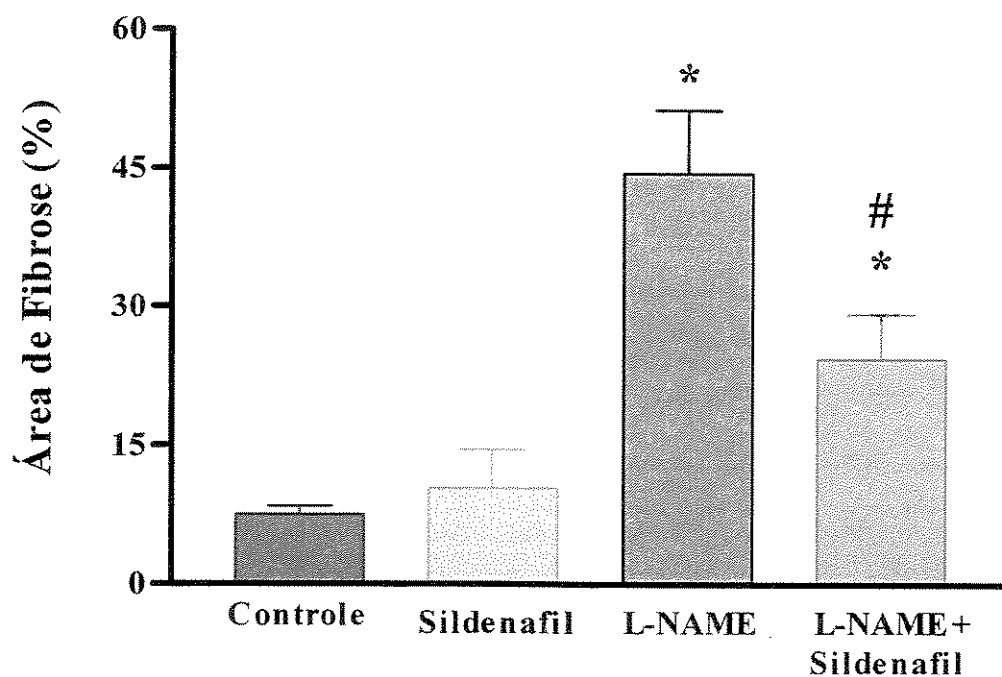


Figura 17. Áreas de fibrose miocárdica avaliada através de microscopia ótica em cortes histológicos dos corações de animais dos grupos experimentais Controle (n=10), L-NAME (n=10), Sildenafil (n=10) e L-NAME + Sildenafil (n=10) após 8 semanas de tratamento. Coloração de Tricrômio de Masson. Os valores estão expressos em % ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle; # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

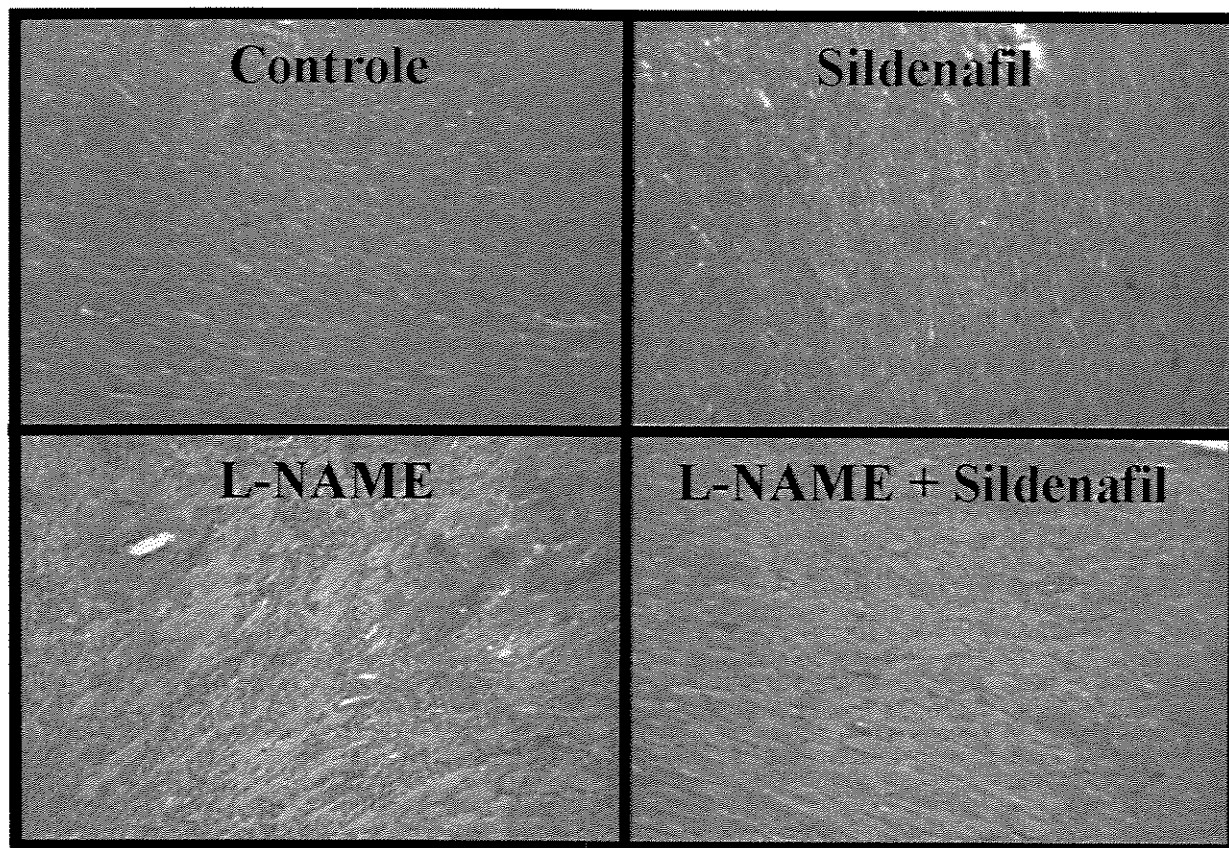


Figura 18. Fotos representativas das áreas de lesão observadas nos grupos experimentais após 8 semanas de tratamento. Efeito cardioprotetor parcial do sildenafil na miocardiopatia hipertensiva induzida por L-NAME. Os corações dos animais tratados com L-NAME mostram extensas áreas de fibrose intersticial. Além da redução na área total de fibrose no grupo L-NAME + Sildenafil observamos um padrão focal nas lesões miocárdicas. Hematoxilina-Eosina, 40X.

3.2.3. Espessura da Camada Média Vascular

A avaliação da espessura da CMV mostrou redução significativa da espessura da camada vascular média no grupo Sildenafil quando comparado ao grupo Controle (0.243 ± 0.0453 vs. 0.298 ± 0.0244 μm , respectivamente). Os grupos L-NAME (0.540 ± 0.0294 μm) e L-NAME + Sildenafil (0.408 ± 0.0523 μm) apresentaram uma espessura de CMV significativamente aumentada em relação ao grupo Controle. Por outro lado, os corações do grupo L-NAME + SILDENAFIL apresentaram expressiva redução na espessura da CMV em relação ao grupo L-NAME. (Figura 19 e 20)

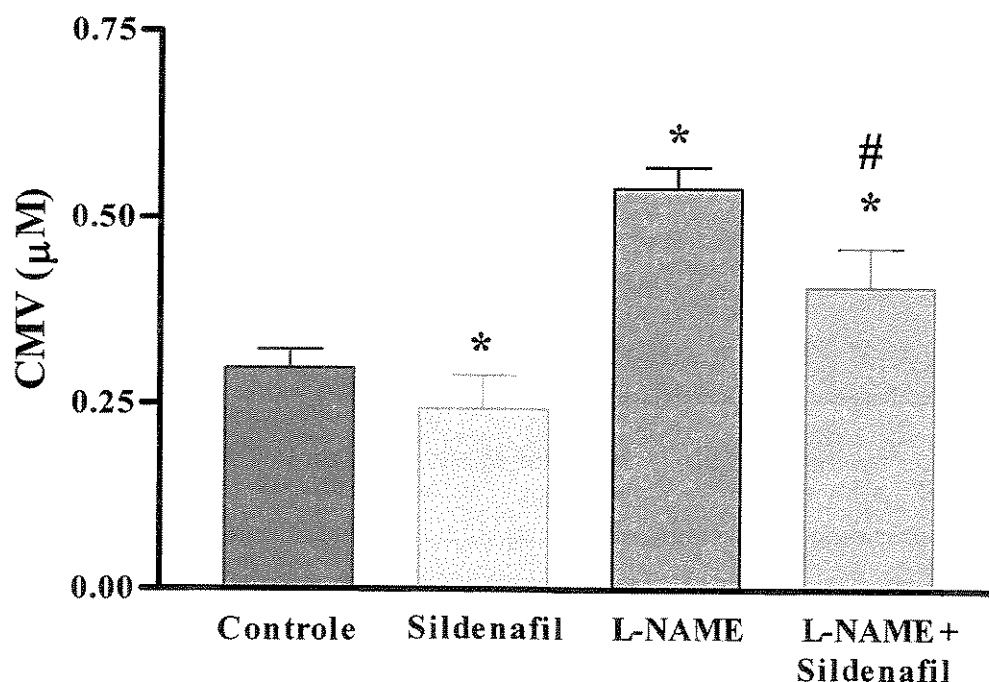


Figura 19 Medidas da espessura da camada muscular média vascular (CMV) das artérias cardíacas dos animais tratados por 8 semanas dos grupos Controle (n=10); L-NAME (n=10); Sildenafil (n=10) e L-NAME + Sildenafil (n=10). Essa medida levou em conta a relação da espessura da CM e a luz dos vasos. Os valores foram expressos em μm ($\bar{x} \pm \text{DP}$). * $P < 0,05$ vs.. Controle; # $P < 0,05$ vs.. L-NAME.

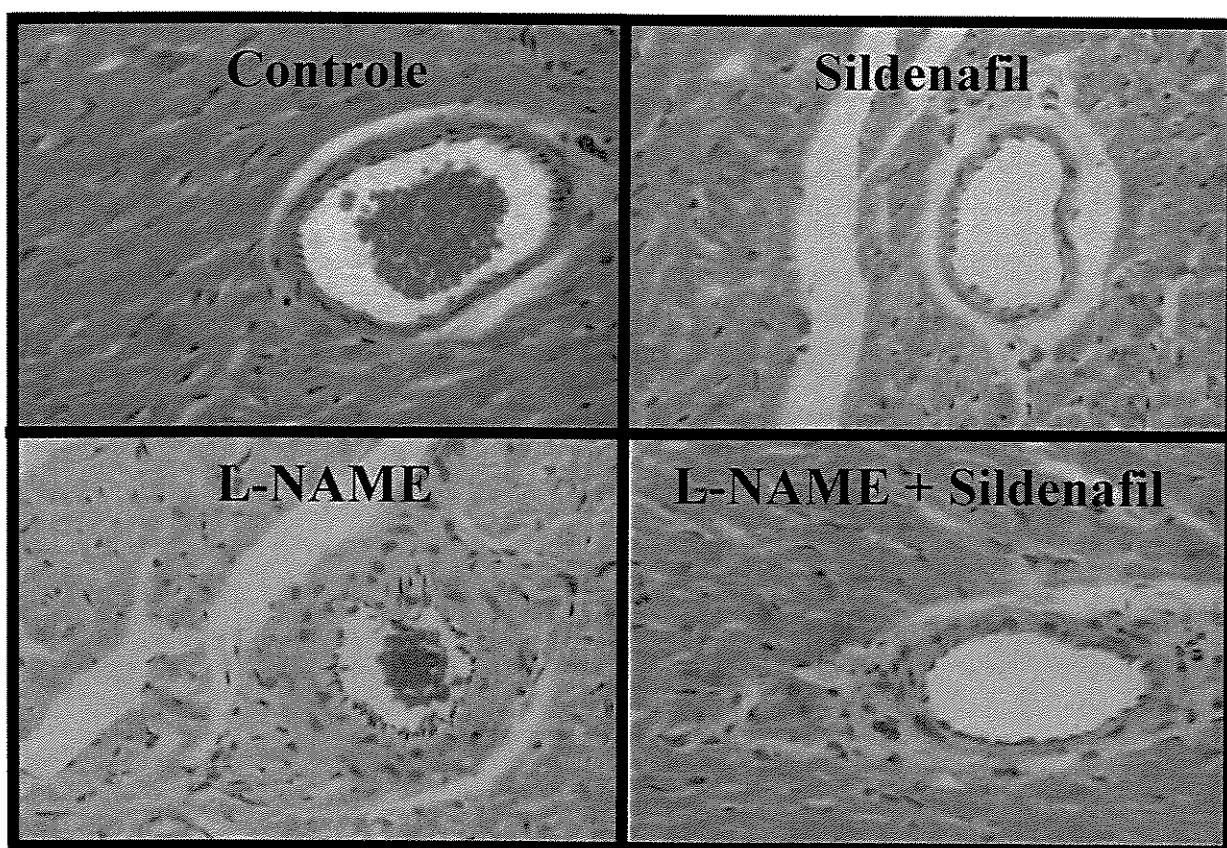


Figura 20. Fotos representativas das áreas de hipertrofia da camada vascular média observada nos grupos L-NAME e L-NAME + Sildenafil, onde observamos o efeito de proteção parcial do sildenafil na miocardiopatia induzida por L-NAME. Hematoxilina-Eosina, 40X.

3.3. Imunohistoquímica

3.3.1. Análises quantitativas

PDE5

A localização da PDE5 no coração foi visualizada em cortes de ventrículo esquerdo incubado com anticorpo IgG anti-PDE5 resultando em marcação na camada média vascular e células endoteliais, mas não na camada adventícia dos vasos (artérias e veias). Também observamos marcação nos discos intercalares do tecido miocárdico

Nos vasos, a análise Imunohistoquímica mostrou significativa redução na marcação da camada vascular média das arteríola (10 – 50 μ m) nos ratos tratados cronicamente com L-NAME quando comparados aos animais do grupo controle, porém essa redução foi totalmente restaurada no grupo de animais que recebeu L-NAME e Sildenafil simultaneamente. Por outro lado, nos animais do grupo Sildenafil a marcação mostrou-se significativamente exacerbadas comparadas aos outros grupos estudados. **(Figura 21)**

Nas artérias de maior calibre (< 100 μ m), todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de intensidade e marcação, não havendo diferença significativa entre os grupos.

No tecido cardíaco, observamos intensa marcação nos discos intercalares mas os miócitos não apresentaram nenhuma marcação. No grupo L-NAME, a marcação dos discos intercalares NAME teve uma redução significativa quando comparado ao grupo Controle. No grupo Sildenafil, observamos um aumento significativo na intensidade de marcação se comparado ao grupo Controle. Finalmente, o padrão e a intensidade de marcação encontrados no grupo L-NAME + Sildenafil não diferiram estatisticamente do grupo Controle. **(Figura 22)**

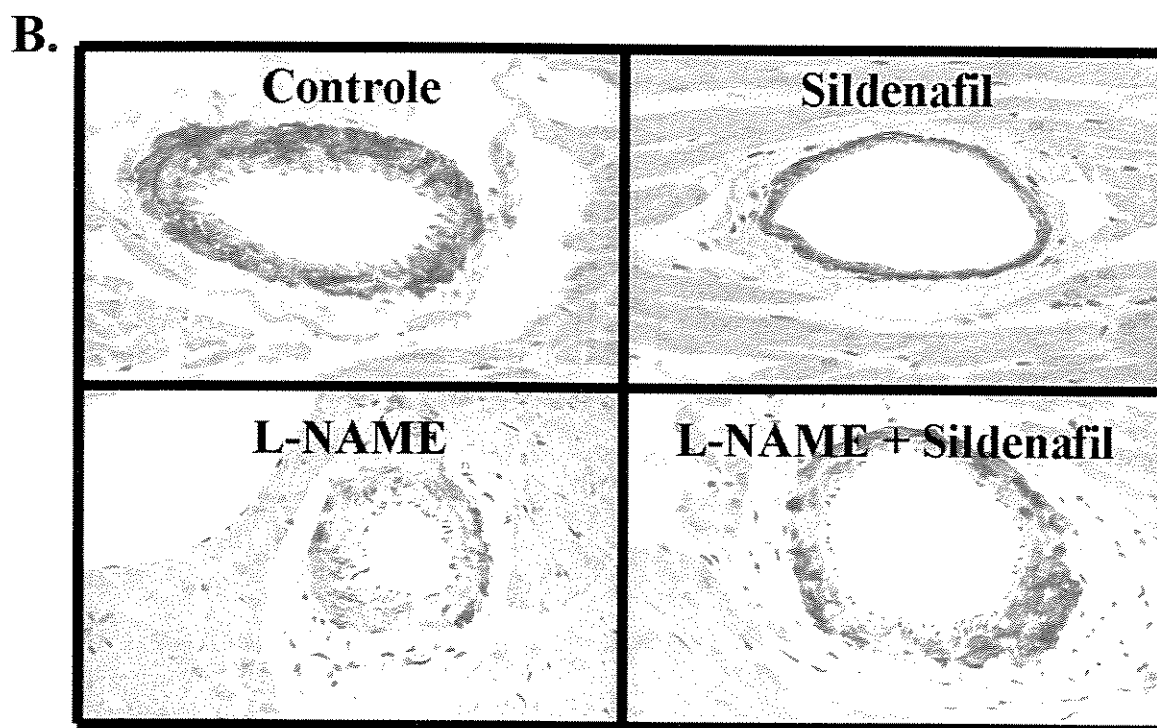
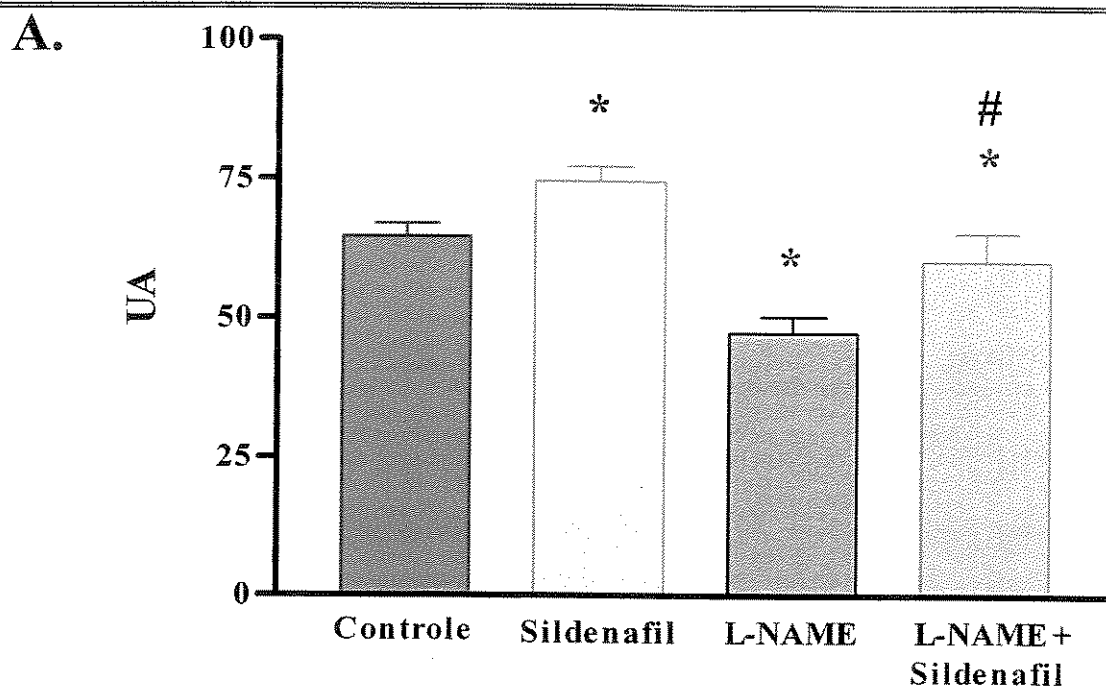


Figura 21. Imunohistoquímica para PDE5 no tecido cardíaco. **A.** Gráfico com resultados da análise quantitativa da intensidade de marcação na CML de vasos de pequeno calibre (10-50 μ m). **B.** Fotos representativas dos grupos estudados. Os valores estão expressos em Unidade Arbitrária (UA) ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle. # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

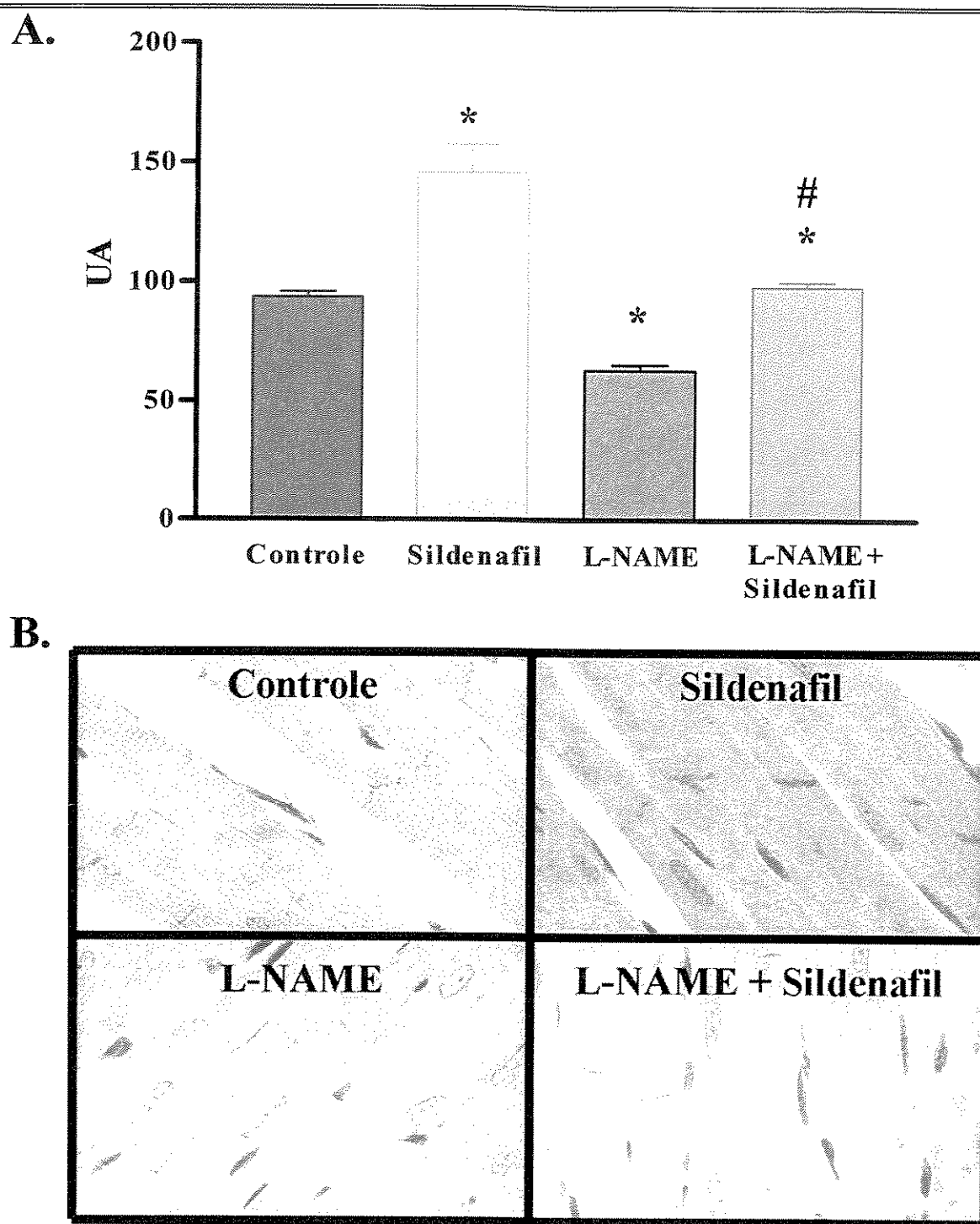


Figura 22. Imunohistoquímica para PDE5 no tecido cardíaco. **A.** Gráfico com resultados da análise quantitativa da intensidade de marcação nos Discos Intercalares do tecido cardíaco. **B.** Fotos representativas dos grupos estudados. Os valores estão expressos em Unidade Arbitrária (UA) ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle. # $P < 0,05$ vs. L-NAME

PDE3

Ao analisarmos a marcação das PDE3 nos corações dos animais dos grupos estudados, observamos que a marcação para esta enzima estava nitidamente na camada adventícia dos vasos (veias e artérias). O endotélio vascular apresentou marcação positiva para PDE3, mas de forma menos intensa.

Os miócitos apresentaram suave marcação positiva para PDE3, mas não houve variação na intensidade ou local de marcação entre os grupos experimentais. Por outro lado, nos grupos L-NAME e L-NAME+Sildenafil observamos intensa marcação nas áreas de lesões e tecido reparativo. (**Figura 23**)

Na análise quantitativa da intensidade de marcação na camada adventícia dos vasos, observamos diferença no grupo Sildenafil, que apresentou marcação significativamente aumentada. Os demais grupos apresentaram mesmo padrão e intensidade de marcação. Esse aumento na intensidade de marcação apresentou-se tanto nos vasos de menor quanto nos de maior calibre. (**Figura 24**)

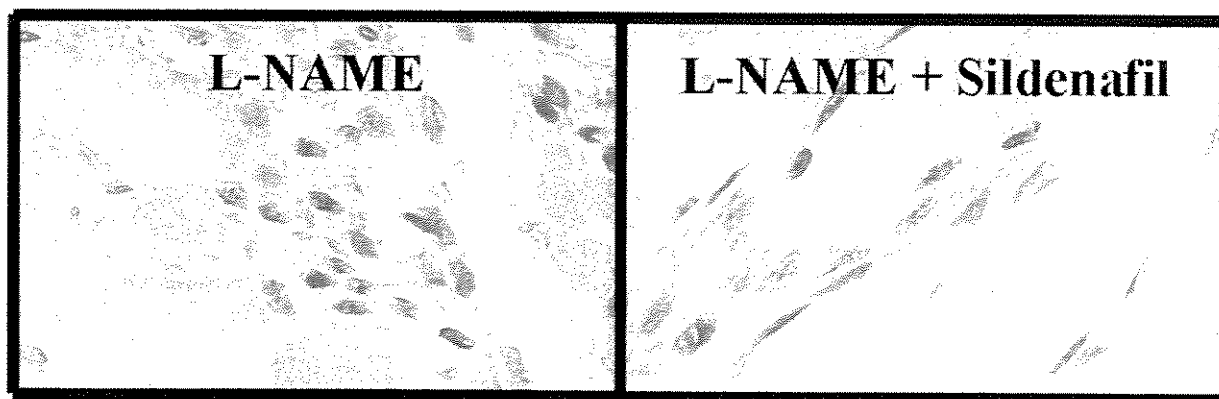


Figura 21. Imunohistoquímica para PDE3 no músculo cardíaco. Fotos representativas da marcação positiva nas áreas de lesão e tecido reparativo. Hematoxilina, 100x.

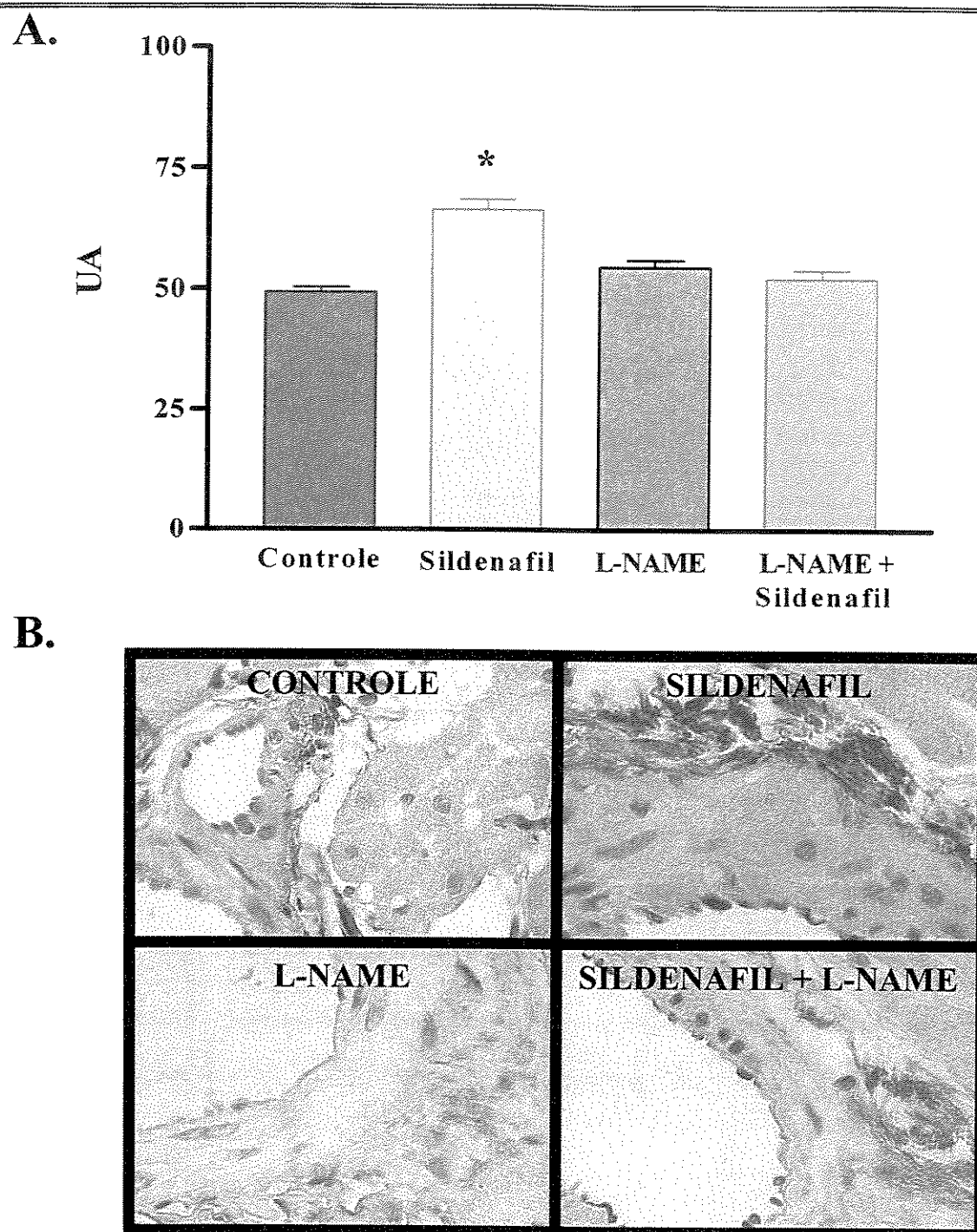


Figura 24. Imunohistoquímica para PDE3 no tecido cardíaco. **A.** Gráfico da análise quantitativa da intensidade de marcação na Camada Adventícia dos vasos do tecido cardíaco. **B.** Fotos representativas dos grupos estudados. Os valores estão expressos em Unidade Arbitrária de Medida (UAM) ($\bar{X} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle. # $P < 0,05$ vs. L-NAME

4. GMPc Plasmático

As dosagens bioquímicas de GMPc plasmático (pg/ml) mostraram que o grupo L-NAME teve uma redução significativa quando comparado ao grupo Controle. No grupo Sildenafil, observou-se aumento significativo nos níveis de GMPc plasmático se comparado ao grupo Controle. Finalmente, os valores encontrados no grupo L-NAME + Sildenafil não diferiram estatisticamente do grupo Controle. (Figura 25)

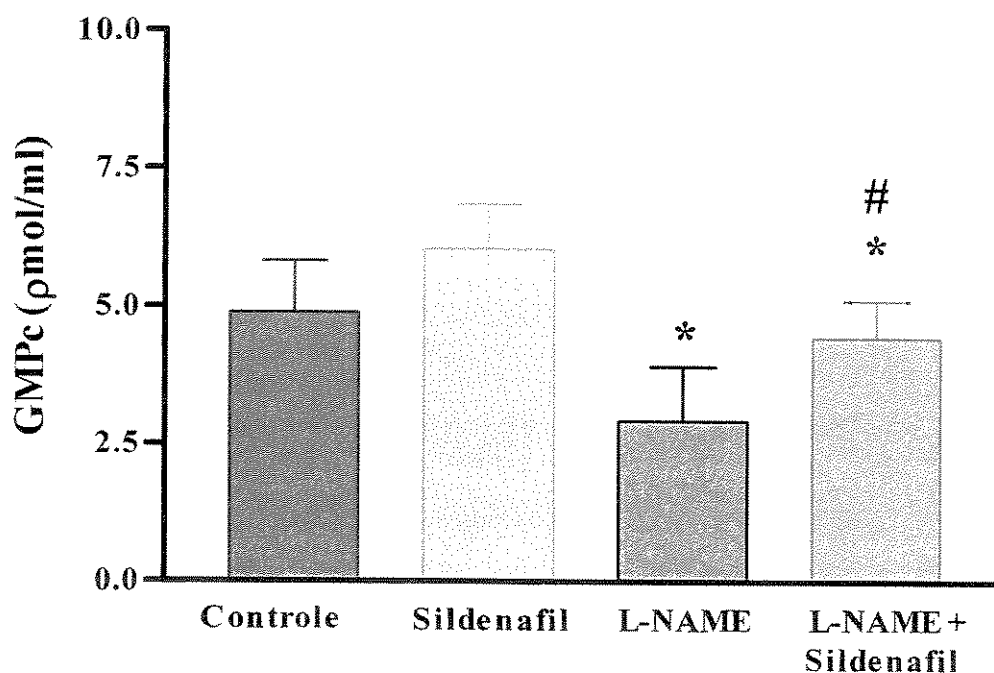


Figura 25. Quantificação do GMPc plasmático (ELISA) após 8 semanas de tratamento grupos Controle; L-NAME; Sildenafil e L-NAME + Sildenafil. Os valores estão expressos em pmol/ml ($\bar{x} \pm DP$). * $P < 0,05$ vs. Controle. # $P < 0,05$ vs. L-NAME.

3.3.2. Análises semi - quantitativas

eNOS

No grupo Sildenafil houve uma leve redução na expressão da enzima eNOS nas células endoteliais. Nos demais grupos a expressão dessa enzima não mostrou alterações mantendo uma intensidade moderada de marcação. (**Tabela 3**)

Tabela 3. Quantificação semi-quantitativa da expressão da enzima eNOS nas células endoteliais dos vasos do tecido cardíaco.

	Controle	Sildenafil	L-NAME	L-NAME + Sildenafil
Células endoteliais	++	+	++	++

iNOS

Não observamos alterações na expressão da enzima iNOS entre os grupos experimentais deste estudo. A intensidade de marcação foi muito fraca (+) em todos os grupos.

Discussão

A inibição crônica da NOS por L-NAME (PALMER et al., 1988; PALMER et al., 1987; REES et al., 1989) é um modelo de hipertensão muito bem estabelecido caracterizado por severa e progressiva elevação na pressão arterial (ARNAL et al., 1993; BAYLIS et al., 1992; MORENO JUNIOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 1992) associada com redução do fluxo coronário (MORENO et al., 1997) e débito cardíaco (AMRANI et al., 1992; JOVER et al., 1993), aumento da RVPT (HERITY et al., 1994; HUANG et al., 1995) e diminuição do relaxamento vascular (HOLECYOVA et al., 1996). Hipertrofia cardíaca (MORENO et al., 1996), aumento do diâmetro de miócito (NUMAGUCHI et al., 1995) e remodelamento miocárdico e vascular (aumento da relação entre a parede vascular e o lúmen do vaso e fibrose perivascular) (HUANG et al., 1995; LI e SCHIFFRIN, 1994) também são descritos como características deste modelo. As alterações miocárdicas consistem em extensas áreas de fibrose e necrose miocárdicas, especialmente nas regiões subendocárdicas (MORENO et al., 1996). As concentrações de GMPc intracelular estão geralmente reduzidas (DENG et al., 1993). Além disso, o tratamento crônico com L-NAME resulta em significativa redução do fluxo sanguíneo do coração, pulmão, fígado, diafragma, músculo esquelético e rins (HUANG et al., 1995), necrose dos glomérulos com conseqüente queda na filtração glomerular (BAYLIS et al., 1992; ZATZ e BAYLIS, 1998).

Nossos resultados reforçam dados bem estabelecidos na literatura referentes à inibição crônica da síntese de NO por L-NAME (administração oral) com aumento significativo na pressão arterial média (PAM) quando comparados ao grupo CONTROLE (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992). Embora a inibição da PDE5 eleve os níveis de concentração do GMPc, um mediador da vasodilatação (WALDMAN e MURAD, 1988), não observamos em nosso trabalho qualquer efeito isolado do sildenafil na PAM de ratos normotensos quando administrado cronicamente, quer durante o período de estudo (PA cauda), quer após 8 semanas (PAM intra-arterial em ratos anestesiados), embora descrito por outros pesquisadores em espécies distintas de

mamíferos (ISHIZUKA et al., 2000; OCKAILI et al., 2002; YOO et al., 2002), inclusive em humanos (CHEITLIN et al., 1999; CHIU e REID, 2002; JACKSON et al., 1999; KLONER e ZUSMAN, 1999; MAHMUD et al., 2001). Nos animais tratados, concomitantemente, com citrato de sildenafil e L-NAME observamos uma significativa atenuação da PAM após a 6^a semana de tratamento. Essa queda na pressão arterial estava associada com significativa redução da RVPT. Sildenafil também restaurou parcialmente a diminuição no DC em ratos tratados com L-NAME.

Mecanismos de adaptação entre as atividades dos sistemas da PD5/GMPc e do sistema simpático podem constituir uma explicação para o efeito moderado do fármaco sobre a PAM obtido em nosso trabalho. O aumento da ativação simpática causado pela administração crônica de sildenafil (PHILLIPS et al., 2000) seria uma importante resposta compensatória aos efeitos vasodilatadores do fármaco (CREMERS et al., 2003; GILLIES et al., 2002; KATZ et al., 2000; NAKATSU e DIAMOND, 1989; RYBALKIN et al., 2003) suficiente para manter a PAM sem causar taquicardia reflexa. Ratos tratados cronicamente com L-NAME apresentam atividade simpática exacerbada (FIORINO, 2004) e neste caso, o efeito vasodilatador do sildenafil será capaz de melhorar a perfusão dos órgãos e reduzir a PAM de forma mais acentuada (ARORA et al., 1999; CHEITLIN et al., 1999), como observamos no grupo L-NAME + sildenafil. O efeito estimulatório que o sildenafil exerce sobre a secreção de renina (CHIU e REID, 2002) é outra hipótese a ser levada em conta, esta ação poderia ajudar a explicar porque o sildenafil normalmente apresenta efeitos moderados sobre a PAM (CHEITLIN et al., 1999; JACKSON et al., 1999; KLONER e ZUSMAN, 1999) apesar da PDE5 estar amplamente distribuída nos tecidos vasculares (BEAVO, 1995; BOOLELL et al., 1996; SAMPSON et al., 2001; WALLIS et al., 1999).

A redução da RVPT provavelmente está relacionada com a inibição da PDE5 em vasos arteriais de resistência (CREMERS et al., 2003; KLONER, 2004) e aumento na complacência

venosa (JACKSON et al., 1999). O sildenafil pode causar relaxamento do músculo vascular liso através da acentuada elevação nos níveis de GMPc (MEDINA et al., 2000; MEDINA et al., 2002; VALLANCE, 1996; WALLIS et al., 1999) e/ou redução da concentração intracelular de Ca^{+2} ou da sensibilidade ao Ca^{+2} (MOCHIDA et al., 2002; SCHLOSSMANN et al., 2003). Sildenafil tem demonstrado alterar parâmetros hemodinâmicos em humanos (HERRMANN et al., 2000; JACKSON et al., 1999; MALOZOWSKI e SAHLROOT, 2000; TRAVERSE et al., 2000), mas sua atividade vascular já era prevista, uma vez que foi sintetizado como uma possível nova droga antianginosa (KLONER e ZUSMAN, 1999).

Embora o endotélio coronariano seja o principal responsável pela produção fisiológica de NO no coração (PINSKY et al., 1997; SHAH e MACCARTHY, 2000), NO também pode ser sintetizado dentro dos próprios miócitos (produção autócrina) pela eNOS (BALLIGAND et al., 1993; BALLIGAND et al., 1995). A regulação dinâmica da síntese de NO no coração é dinâmica, controlada batimento a batimento, aparentemente em resposta a alterações no fluxo coronário e resistência miocárdica (PINSKY et al., 1997). Até recentemente, os efeitos do NO no coração eram descritos como inotrópicos negativos, mediados principalmente através de mecanismos relacionados com o GMPc, tais como redução do influxo de Ca^{+2} por canais tipo L, mediada pela ativação de PDEs (HAN et al., 1995; MERY et al., 1993) ou PKG e/ou fosfatases (MERY et al., 1991; WAHLER e DOLLINGER, 1995). Apesar disso, diversos estudos têm mostrado que sob certas condições doadores de NO são capazes de aumentar a contratilidade miocárdica (KOJDA et al., 1996; MOHAN et al., 1996) e que a produção basal intracardíaca de NO aumenta significativamente a resposta (força) de Frank-Starling no coração isolado (PRENDERGAST et al., 1997). Esse aumento de contratilidade pela via NO/GMPc ocorre pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc devido à inibição da PDE3 (KOJDA et al., 1996) por elevações nas concentrações de GMPc.

Esses efeitos da sinalização do GMPc no coração, além dos efeitos vasculares, podem nos ajudar a explicar as alterações no débito cardíaco através de outras ações da inibição da PDE5. Sildenafil eleva as concentrações de GMPc por inibir a sua hidrólise (WALLIS et al., 1999), porém um dos mecanismos de ação propostos para o GMPc é o de inibir alguns tipos de PDE reguladas por GMPc (FEIL et al., 2003; MAURICE, 2003; MAURICE et al., 2003), dessa forma a inibição da PDE5 inibiria de forma indireta a PDE3 (VILA-PETROFF et al., 1999; WALLIS et al., 1999) e causando um aumento nas concentrações de AMPc. Sendo assim, o aumento no débito cardíaco observado no grupo L-NAME + sildenafil pode ser atribuído a um efeito inotrópico positivo resultante da utilização do sildenafil (STIEF et al., 2000; SUGIYAMA et al., 2002). Por estar expressa em grandes quantidades no tecido cardíaco, inibição da PDE3 causa substancial aumento na contratilidade cardíaca (BEAVO, 1995). Isso ocorre através de um aumento na corrente de Ca^{+2} devido à fosforilação dependente de AMPc e ativação dos canais de cálcio voltagem-dependente da membrana plasmática dos cardiomiócitos (REEVES e ENGLAND, 1990). O desenvolvimento de miocardiopatia dilatada está associado com uma diminuição da expressão dos genes e da atividade da PDE3 (SMITH et al., 1997) e a utilização de inibidores seletivos da PDE3 no tratamento da insuficiência cardíaca já está bem estabelecido (JASKI et al., 1985; SHAKAR et al., 1998).

A associação de hipertensão arterial (HA) e alterações cardiovasculares como: hipertrofia, fibrose intersticial e perivascular, necrose miocárdica e alterações vasculares induzidas pela inibição crônica da síntese de NO foram previamente descritas por nosso grupo (MORENO et al., 1996; MORENO et al., 1997; SAMPAIO et al., 2002) e por outros autores. (ARNAL et al., 1993; ARNAL et al., 1992; BABAL et al., 1997; BERNATOVA et al., 1999; BERNATOVA et al., 1999; BREDE et al., 2003; JOVER et al., 1993; PECHANOVA et al., 1999; SIMKO et al., 2004). Nossos resultados da pesagem do coração, VE e cálculo dos respectivos índices vão de

encontro aos dados da literatura mostrando diferença significativa entre os grupos experimentais, com nítida hipertrofia cardíaca no grupo L-NAME. O tratamento com sildenafil conseguiu uma prevenção parcial destas alterações. Além disso, os resultados da avaliação de desenvolvimento e prevenção de hipertrofia cardíaca pela quantificação dos diâmetros de miócitos por microscopia ótica nos mostram uma hipertrofia acentuada no grupo L-NAME que foi parcialmente prevenida quando os animais receberam sildenafil simultaneamente. A redução da HA e a restauração mesmo que parcial do IC já contribuem para atenuar o remodelamento cardíaco e a disfunção cardíaca associada à miocardiopatia hipertensiva induzidas por L-NAME. Mas podemos atribuir parte desses resultados a um efeito cardioprotetor induzido pelo tratamento crônico com sildenafil (KUKREJA et al., 2004). Outros trabalhos têm descrito efeitos cardioprotetores induzidos pela inibição crônica da PDE5 em modelos agudos de isquemia e reperfusão (OCKAILI et al., 2002) e hipotetizam que a ação vasodilatadora do sildenafil possa ter potencialmente liberado mediadores endógenos tais como adenosina ou bradicinina das células endoteliais, que podem ter aumentado a cascata de sinalização resultando na fosforilação da NOS e liberação de NO. Neste mesmo trabalho, sildenafil não alterou o fluxo coronariano pré- ou pós-isquemia, indicando que seu efeito cardioprotetor pode ser independente do seu efeito vascular. Takimoto e colaboradores (TAKIMOTO et al., 2005) também descrevem os efeitos cardioprotetores do sildenafil na hipertrofia cardíaca e acreditam na participação da PDE5 em diversos mecanismos hipertróficos e que sua inibição possa impedir, pelo menos em parte, a hipertrofia cardíaca.

“Cross-talk” entre GMPc e AMPc (VILA-PETROFF et al., 1999) também pode colaborar no efeito de proteção ao miocárdio observado. A presença de fosfodiesterase 5 em cardiomiócitos, um pré-requisito para essa teoria, é controversa, mas alguns trabalhos mostram evidências da expressão da PDE5 em cardiomiócitos de cães (SENZAKI et al., 2001) e aumento

do GMPc em experimentos de órgão isolado com tecido cardíaco humano (MUIRHEAD et al., 2002). Um aumento do AMPc induzido pelo sildenafil (STIEF et al., 2000) pode ser uma das explicações para alguns dos efeitos cardiovasculares observados em nosso estudo e relatados em outros trabalhos (CHEITLIN et al., 1999; SPEAKMAN e KLONER, 1999). Esses achados reforçam nossa hipótese inicial de trabalho de que os efeitos cardiovasculares relacionados à inibição da PDE5 possam ser devidos à interação das vias dos segundos mensageiros AMPc e GMPc (MOVSESIAN e ALHARETHI, 2002; VILA-PETROFF et al., 1999). Esta interação é proposta, inclusive, para os efeitos da inibição da PDE5 no tratamento da disfunção erétil (UCKERT et al., 2004).

A PDE3, pode se diferenciar das outras PDEs por sua alta afinidade tanto pelo AMPc quanto pelo GMPc, com valores de K_m em torno de 0.1-0.8 μ M para AMPc, sendo 4-10 vezes mais alto do que para GMPc (BEAVO, 1995; CONTI et al., 1995; DEGERMAN et al., 1997). Dessa forma, AMPc e GMPc são substratos que competem pela PDE3, diferenciando-a da isoforma PDE4 que também apresenta alta afinidade pelo AMPc, mas não pode ser inibida pelo GMPc (DEGERMAN et al., 1997).

A prevenção do remodelamento da camada média vascular pode ser explicada pelos efeitos antiproliferativos do GMPc nas células do músculo liso (ABELL et al., 1989; FURUYA et al., 1991; GARG e HASSID, 1989; KARIYA et al., 1989; NAKAKI et al., 1990) que são exacerbados pelo *cross-talk* entre PDE3 e PDE5. Ambos os nucleotídeos, GMPc e AMPc, inibem a proliferação das células do MVL (LLOYD-JONES e BLOCH, 1996; LOESBERG et al., 1985; SARKAR et al., 1997; SARKAR e WEBB, 1998). Além dos seus efeitos inibitórios na proliferação de células do músculo liso, AMPc e GMPc também inibem a migração das células do músculo liso (BORNFELDT et al., 1995; DUBEY et al., 1995; PALMER et al., 1998; SARKAR et al., 1996) e a síntese de algumas matrizes extracelular (DEY et al., 1998; KAJI et

al., 1996; PASSARETTI et al., 1996). Dessa forma, elevados níveis de AMPc e GMPc parecem agir em sinergismo e inibir muitas das respostas das células do MVL à lesão arterial e, talvez, manter a contratilidade e o fenótipo antiproliferativo (BOERTH et al., 1997).

O aumento de GMPc plasmático devido à inibição da fosfodiesterase 5 pode ser o responsável pelo relaxamento das células do músculo vascular liso e conseqüente vasodilatação arterial sistêmica (ISHIZUKA et al., 2000; MAURICE, 2003; MAURICE et al., 2003; MEDINA et al., 2000). Este mecanismo pode refletir também o aumento de GMPc no músculo vascular liso (BIVALACQUA et al., 2004; CORBIN e FRANCIS, 2003) e no miocárdio (DAS et al., 2002). Demonstrando que os mecanismos NO-GMPc têm um importante papel na regulação da pressão arterial e que doses terapêuticas de sildenafil usadas no tratamento da disfunção erétil podem ter efeitos significativos na hemodinâmica. A quantificação de GMPc plasmático mostra que o sildenafil restaura os níveis plasmáticos de GMPc nos animais do grupo L-NAME + Sildenafil. O aumento deste nucleotídeo cíclico promove a ativação de PKs que, por sua vez, levam à fosforilação de diferentes tipos de substratos, regulando inúmeras respostas celulares (PERRY e HIGGS, 1998). Também podemos observar a importância da PDE5 na manutenção e controle cardiovascular através do grupo L-NAME.

O tratamento crônico com L-NAME reduz os níveis de GMPc significativamente (ARNAL et al., 1992; DENG et al., 1993; PECHANOVA e BERNATOVA, 1996; PECHANOVA et al., 1999) e sugere que neste modelo, outros mecanismos de formação de GMPc, tais como mecanismo peptídeo atrial natriurético/guanilato ciclase particulada, são incapazes de compensar a deficiência na formação do GMPc resultante da inibição da NOS. Além disso, a inibição crônica da síntese de NO reduz os níveis circulantes de ANF e a infusão de ANF em ratos L-NAME é incapaz de restaurar estes níveis de ANF, indicando que os níveis de GMPc dependem principalmente da atividade da guanilato ciclase solúvel (ARNAL et al.,

1992). Dessa forma, as alterações da guanilato ciclase particulada podem ser de pouca importância na no acúmulo vascular de GMPc. Uhlenius *et al.* (UHLENIUS *et al.*, 1996) demonstrou que apesar de em alguns estudos os níveis de ANF permanecerem inalterados após 12 semanas de tratamento com L-NAME, os níveis de GMPc foram significativamente reduzidos nesses animais. Por outro lado, Lee *et al.* (LEE *et al.*, 2002) demonstrou que havendo um aumento nos níveis de ANF nesse modelo de hipertensão, a atividade da guanilato ciclase particulada estava reduzida como resultado de um mecanismo de “*down-regulation*” dos receptores de ANF, NPR-A e NPR-C. Yoshimoto *et al.* (YOSHIMOTO *et al.*, 1995) também demonstrou que a expressão vascular do RNAm de NPR-A estava diminuída na HA induzida pela inibição crônica da sintase de NO. Estes estudos indicam que ANF não contribui significativamente para os efeitos benéficos da utilização crônica do inibidor de PDE5.

Observamos redução significativa nas áreas de lesão dos animais do grupo L-NAME + sildenafil em comparação ao grupo L-NAME. Esses efeitos podem ser conseqüentes à inibição da PDE5 pelo sildenafil no miocárdio isquêmico neste modelo de miocardiopatia hipertensiva, com efeitos vasodilatadores, arterial e venoso, reduzindo pré- e pós-carga (MEHTA *et al.*, 1988) ou mantendo a perfusão coronariana adequada (REFFELMANN e KLONER, 2003). Outra hipótese é a de que o sildenafil estimule a liberação de fatores tais como bradicinina ou NO com efeitos cardioprotetores no miocárdio (TSCHOPE *et al.*, 2004; VEERAVALLI *et al.*, 2003). Da mesma forma, Ockilli *et al.* (2002) demonstraram efeitos cardioprotetores induzidos pelo sildenafil, via canais de potássio, em modelo animal de infarto por isquemia de reperfusão. Por outro lado, Reffelmann e Kloner (2003), em modelo semelhante (coelhos anestesiados), observaram redução de pré-carga e pós-carga, bem como na contratilidade do ventrículo esquerdo, sem atenuar ou exacerbar a necrose miocárdica e a disfunção microvascular.

Os mesmos mecanismos propostos acima podem explicar como a administração crônica de sildenafil juntamente com L-NAME causou redução da RVPT e da pressão arterial com restauração parcial do débito cardíaco nos animais desse grupo. Nossos resultados vêm ao encontro com achados descritos por outros autores, tanto animais (SHEKERDEMIAN et al., 2004) quanto em humanos (MANFROI et al., 2003). Outro estudo (JACKSON et al., 1999) não observou alterações significativas nas medidas destes índices cardíacos, isso talvez possa ser explicado devido à ausência de efeito inotrópico do sildenafil nas doses administradas (GILLIES et al., 2002).

Nossas análises imunohistológicas mostram uma redução significativa na expressão da PDE5 nos vasos de resistência do grupo L-NAME e um aumento também significativo no grupo sildenafil. Isso ocorre por mecanismo de controle de *feedback* negativo (MANGANIELLO e DEGERMAN, 1999). Desta forma, podemos afirmar que as PDE controlam e são controladas pelas concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelulares. Porém os tipos de mecanismos de controle envolvidos nessa resposta de feedback variam com o tempo. Um aumento agudo nas concentrações de AMPc, por exemplo, ativa a PK dependente de AMPc que fosforila a PDE3 que degrada o AMPc. Quando o aumento é crônico a resposta também acontece como *feedback* negativo, mas pelo aumento na transcrição do gene da enzima a ser ativada, resultando indiretamente em aumento de atividade enzimática (FRANCIS et al., 2001). A presença de PDE5 nos vasos cardíacos confirma a importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso vascular e manutenção das funções hemodinâmicas. Por outro lado há necessidade de maiores estudos com relação a atividade enzimática nesses tecidos.

Curiosamente observamos em nosso trabalho marcação intensa de PDE5 nos discos intercalares do tecido cardíaco. Essa expressão estava significativamente diminuída no grupo L-NAME e significativamente aumentada no grupo sildenafil. Os animais que foram tratados

simultaneamente com sildenafil e L-NAME não apresentaram alterações na marcação da PDE5. Esse resultado pode ajudar a explicar os resultados hemodinâmicos obtidos em nosso trabalho. Além de colaborar para o melhor entendimento da expressão da PDE5 no coração, pois esse ponto permanece controvertido (DUNKERLEY et al., 2002; GIORDANO et al., 2001; LOUGHNEY et al., 1998; MCALLISTER-LUCAS et al., 1995; MOVSESIAN, 2000; PANG, 1992; RYBALKIN e BORNFELDT, 1999; RYBALKIN et al., 1997; RYBALKIN et al., 2003; SENZAKI et al., 2001; WALLIS et al., 1999), apesar de alguns estudos demonstrarem fortes evidências da expressão do gene da PDE5 no coração humano (SENZAKI et al., 2001; YANAKA et al., 1998) e de outras espécies (GIORDANO et al., 2001); além da presença de atividade de PDE5 em extratos de tecido cardíaco humano (CORBIN et al., 2003). Nossos dados porém são bem estabelecidos quanto à expressão de PDE5 nos discos intercalares do miocárdio, porém estudos para determinar a atividade dessa enzima são necessários para maior entendimento da sinalização do GMPc no coração e dos efeitos cardíacos da inibição crônica da PDE5.

Conclusões

Nossos resultados demonstram que a administração crônica de sildenafil altera os padrões hemodinâmicos e histológicos do modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição da síntese de NO por L-NAME. Isso pode ser evidenciado através das seguintes observações:

1. A inibição da PDE5 restaura parcialmente os padrões hemodinâmicos, avaliados através da PA, DC e RVPT, no modelo de inibição crônica da síntese de NO.
2. A biodisponibilidade de GMPc, nos animais do grupo L-NAME + sildenafil, é totalmente restaurada após 8 semanas de tratamento.
3. A administração crônica de citrato de sildenafil protege parcialmente o miocárdio e músculo vascular liso contra as lesões e remodelamento cardiovascular característicos deste modelo experimental.
4. A inibição crônica da síntese de NO altera a expressão da PDE5 no músculo vascular liso e nos discos intercalares dos miócitos.

Dessa forma, nossos resultados nos permitem concluir que o sildenafil, através da inibição da PDE5, aumenta a biodisponibilidade do GMPc resultando em um efeito cardioprotetor e antiproliferativo contra as alterações cardiovasculares descritas no modelo de miocardiopatia hipertensiva induzida pela inibição crônica da síntese de NO em ratos Wistar .

Summary

Many of the physiological responses to nitric oxide (NO) are mediated by cyclic 5'-guanosine monophosphate (cGMP), the intracellular levels of which are regulated by phosphodiesterase type 5 (PDE5). In situations of reduced NO formation, the inhibition of PDE5 by selective inhibitors such as sildenafil could be beneficial in restoring physiological functions by enhancing the intracellular levels of cGMP. In this study, we evaluated the effects of sildenafil on the hemodynamic and histological alterations induced by the chronic treatment of rats with N^ω-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME). After 8 weeks of concomitant treatment with sildenafil and L-NAME, arterial blood pressure was significantly lower ($P<0.05$) than in L-NAME treated rats. The fall in blood pressure was associated with a slight reduction in the total peripheral vascular resistance ($P<0.05$). Sildenafil partially restored the decrease in cardiac output seen in L-NAME-treated rats. Morphologically, sildenafil reduced the total area of the myocardial lesions and attenuated the cardiomyocyte and vascular smooth muscle remodeling seen with L-NAME. These results show that sildenafil reversed the deleterious hemodynamic and morphological alterations associated with L-NAME-induced hypertension. This beneficial effect was probably mediated by an increase in cardiac and vascular cGMP levels as reflected in circulating plasma cGMP levels.

Referências Bibliográficas

- ABELL, T. J.; RICHARDS, A. M.; IKRAM, H.; ESPINER, E. A.; YANDLE, T. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. **Biochem Biophys Res Commun**, 160: 1392-6, 1989.
- ADLER, S.; HUANG, H.; LOKE, K. E.; XU, X.; TADA, H.; LAUMAS, A. et al. Endothelial nitric oxide synthase plays an essential role in regulation of renal oxygen consumption by NO. **Am J Physiol Renal Physiol**, 280: F838-43, 2001.
- AHERNE, W. Quantitative methods in histology. **J Med Lab Technol**, 27: 160-70, 1970.
- AMES, J. B.; DIZHOOR, A. M.; IKURA, M.; PALCZEWSKI, K.; STRYER, L. Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. **J Biol Chem**, 274: 19329-37, 1999.
- AMIN, A. R.; ATTUR, M.; PATEL, R. N.; THAKKER, G. D.; MARSHALL, P. J.; REDISKE, J. et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. **J Clin Invest**, 99: 1231-7, 1997.
- AMRANI, M.; O'SHEA, J.; ALLEN, N. J.; HARDING, S. E.; JAYAKUMAR, J.; PEPPER, J. R. et al. Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. **J Physiol**, 456: 681-7., 1992.
- ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, 43: 521-31, 1999.
- ARMOUR, K. E.; ARMOUR, K. J.; GALLAGHER, M. E.; GODECKE, A.; HELFRICH, M. H.; REID, D. M. et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrinology**, 142: 760-6, 2001.
- ARNAL, J. F.; EL AMRANI, A. I.; CHATELLIER, G.; MENARD, J.; MICHEL, J. B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**, 22: 380-7, 1993.
- ARNAL, J. F.; WARIN, L.; MICHEL, J. B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. **J Clin Invest**, 90: 647-52, 1992.
- ARORA, R. R.; TIMONEY, M.; MELILLI, L. Acute myocardial infarction after the use of sildenafil. **N Engl J Med**, 341: 700., 1999.
- ASSENDER, J. W.; SOUTHGATE, K. M.; HALLETT, M. B.; NEWBY, A. C. Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. **Biochem J**, 288 (Pt 2): 527-32, 1992.

- AVONTUUR, J. A.; BUIJK, S. L.; BRUINING, H. A. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock. **Eur J Clin Pharmacol**, 54: 627-31, 1998.
- BABAL, P.; PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I.; STVRTINA, S. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. **Histol Histopathol**, 12: 623-9, 1997.
- BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **J Urol**, 159: 2164-71, 1998.
- BALLIGAND, J. L.; KELLY, R. A.; MARSDEN, P. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 347-51, 1993.
- BALLIGAND, J. L.; KOBZIK, L.; HAN, X.; KAYE, D. M.; BELHASSEN, L.; O'HARA, D. S. et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **J Biol Chem**, 270: 14582-6, 1995.
- BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J Clin Invest**, 90: 278-81, 1992.
- BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev**, 75: 725-48, 1995.
- BEAVO, J. A.; CONTI, M.; HEASLIP, R. J. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Mol Pharmacol**, 46: 399-405, 1994.
- BEAVO, J. A.; REIFSNYDER, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. **Trends Pharmacol Sci**, 11: 150-5, 1990.
- BEDARIDA, G. V.; KIM, D.; BLASCHKE, T. F.; HOFFMAN, B. B. Characterization of an inhibitor of nitric oxide synthase in human-hand veins. **Horm Metab Res**, 26: 109-12, 1994.
- BERNATOVA, I.; PECHANOVA, O.; KRISTEK, F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. **Jpn J Pharmacol**, 81: 99-106, 1999.
- BERNATOVA, I.; PECHANOVA, O.; SIMKO, F. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. **Exp Physiol**, 84: 1095-105, 1999.
- BERTHET, J.; SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. **J Biol Chem**, 229: 351-61, 1957.

- BEVERELLI, F.; BEA, M. L.; PUYBASSET, L.; GIUDICELLI, J. F.; BERDEAUX, A. Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. **Fundam Clin Pharmacol**, 11: 252-9, 1997.
- BIEL, M.; ZONG, X.; LUDWIG, A.; SAUTTER, A.; HOFMANN, F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 135: 151-71, 1999.
- BIFFL, W. L.; MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; BARNETT, C. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. **J Surg Res**, 63: 328-32, 1996.
- BISCHOFF, E.; SCHNEIDER, K. A conscious-rabbit model to study vardenafil hydrochloride and other agents that influence penile erection. **Int J Impot Res**, 13: 230-5, 2001.
- BIVALACQUA, T. J.; USTA, M. F.; CHAMPION, H. C.; LEUNGWATTANAKIJ, S.; DABISCH, P. A.; MCNAMARA, D. B. et al. Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. **Int J Impot Res**, 16: 21-9, 2004.
- BKAILY, G.; SPERELAKIS, N. Injection of guanosine 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels. **Am J Physiol**, 248: H745-9, 1985.
- BLAIR, A.; SHAUL, P. W.; YUHANNA, I. S.; CONRAD, P. A.; SMART, E. J. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. **J Biol Chem**, 274: 32512-9, 1999.
- BOERTH, N. J.; DEY, N. B.; CORNWELL, T. L.; LINCOLN, T. M. Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype. **J Vasc Res**, 34: 245-59, 1997.
- BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M.; GERECKE, U.; FROLICH, J. C. Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. **Cardiovasc Res**, 28: 494-9, 1994.
- BOLGER, G. B. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. **Cell Signal**, 6: 851-9, 1994.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-3, 1994.
- BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S. A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G. J.; NAYLOR, A. M. et al. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, 8: 47-52, 1996.
- BORNFELDT, K. E.; GRAVES, L. M.; RAINES, E. W.; IGARASHI, Y.; WAYMAN, G.; YAMAMURA, S. et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. **J Cell Biol**, 130: 193-206, 1995.

BRADY, T. C.; CHANG, L. Y.; DAY, B. J.; CRAPO, J. D. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. **Am J Physiol**, 273: L1002-6, 1997.

BRAUNWALD, E.; BRISTOW, M. R. Congestive heart failure: fifty years of progress. **Circulation**, 102: IV14-23, 2000.

BREDE, M.; ROELL, W.; RITTER, O.; WIESMANN, F.; JAHNS, R.; HAASE, A. et al. Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. **Hypertension**, 42: 1177-82, 2003.

BROUILLET, E.; ROEDA, D.; VALETTE, H.; FUSEAU, C.; GUYOT, M. C.; CROUZEL, C. In vivo metabolites of N omega-nitro-L-arginine methyl ester: methanol and N omega-nitro-L-arginine. **Eur J Pharmacol**, 293: 487-90, 1995.

BRUNE, B.; SANDAU, K.; VON KNETHEN, A. Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. **Biochemistry (Mosc)**, 63: 817-25, 1998.

BRUNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur J Pharmacol**, 351: 261-72, 1998.

BUGA, G. M.; GOLD, M. E.; FUKUTO, J. M.; IGNARRO, L. J. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. **Hypertension**, 17: 187-93, 1991.

BURGERS, P. M.; ECKSTEIN, F.; HUNNEMAN, D. H.; BARANIAK, J.; KINAS, R. W.; LESIAK, K. et al. Stereochemistry of hydrolysis of adenosine 3':5'-cyclic phosphorothioate by the cyclic phosphodiesterase from beef heart. **J Biol Chem**, 254: 9959-61, 1979.

BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. **J Biol Chem**, 237: 1244-50, 1962.

CHAO, C.; MADEDDU, P.; WANG, C.; LIANG, Y.; CHAO, L.; CHAO, J. Differential regulation of kallikrein, kininogen, and kallikrein-binding protein in arterial hypertensive rats. **Am J Physiol**, 271: F78-86, 1996.

CHARBONNEAU, H. In: BEAVO, J. A.; HOUSLAY, M. D. **Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action** ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc, 1990, p. 267-96.

CHEITLIN, M. D.; HUTTER, A. M., JR.; BRINDIS, R. G.; GANZ, P.; KAUL, S.; RUSSELL, R. O., JR. et al. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. Technology and Practice Executive Committee. **Circulation**, 99: 168-77., 1999.

CHEN, L. Y.; MEHTA, J. L. Downregulation of nitric oxide synthase activity in human platelets by nitroglycerin and authentic nitric oxide. **J Investig Med**, 45: 69-74, 1997.

CHEN, Y.; DU, R.; TRAVERSE, J. H.; BACHE, R. J. Effect of sildenafil on coronary active and reactive hyperemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279: H2319-25., 2000.

CHINKERS, M.; GARBERS, D. L. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. **Science**, 245: 1392-4, 1989.

CHIU, Y. J.; REID, I. A. Effect of sildenafil on renin secretion in human subjects. **Exp Biol Med (Maywood)**, 227: 620-5., 2002.

CLANCY, R. M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; ABRAMSON, S. B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J Clin Invest**, 90: 1116-21, 1992.

COELHO-FILHO, O. R.; DE LUCA, I. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; CITTADINO, M.; SAMPAIO, R. C.; COELHO, O. R. et al. Pravastatin reduces myocardial lesions induced by acute inhibition of nitric oxide biosynthesis in normocholesterolemic rats. **Int J Cardiol**, 79: 215-21, 2001.

CONTI, M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. **Mol Endocrinol**, 14: 1317-27, 2000.

CONTI, M.; JIN, S. L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, 63: 1-38, 1999.

CONTI, M.; NEMOZ, G.; SETTE, C.; VICINI, E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocr Rev**, 16: 370-89, 1995.

CORBIN, J.; RANNELS, S.; NEAL, D.; CHANG, P.; GRIMES, K.; BEASLEY, A. et al. Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart. **Curr Med Res Opin**, 19: 747-52, 2003.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J Biol Chem**, 274: 13729-32., 1999.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. **Int J Clin Pract**, 56: 453-9., 2002.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Molecular biology and pharmacology of PDE-5-inhibitor therapy for erectile dysfunction. **J Androl**, 24: S38-41, 2003.

CRAVEN, P. A.; DERUBERTIS, F. R. Effects of thiol inhibitors on hepatic guanylate cyclase activity. **Biochim Biophys Acta**, 524: 231-44, 1978.

CREMERS, B.; SCHELER, M.; MAACK, C.; WENDLER, O.; SCHAFERS, H. J.; SUDKAMP, M. et al. Effects of sildenafil (viagra) on human myocardial contractility, in vitro arrhythmias,

and tension of internal mammaria arteries and saphenous veins. **J Cardiovasc Pharmacol**, 41: 734-43, 2003.

CUNHA, R. S.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. **Am J Hypertens**, 6: 806-9, 1993.

CURRAN, R. D.; FERRARI, F. K.; KISPERS, P. H.; STADLER, J.; STUEHR, D. J.; SIMMONS, R. L. et al. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. **Faseb J**, 5: 2085-92, 1991.

DACHMAN, W. D.; FORD, G. A.; BLASCHKE, T. F.; HOFFMAN, B. B. Mechanism of bradykinin-induced venodilation in humans. **J Cardiovasc Pharmacol**, 21: 241-8, 1993.

DAS, S.; MAULIK, N.; DAS, D. K.; KADOWITZ, P. J.; BIVALACQUA, T. J. Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase 5. **Drugs Exp Clin Res**, 28: 213-9, 2002.

DE OLIVEIRA, C. F.; NATHAN, L. P.; METZE, K.; MORENO, H., JR.; DE LUCA, I. M.; SUCUPIRA, M. et al. Effect of Ca²⁺ channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. **Eur J Pharmacol**, 373: 195-200, 1999.

DEGERMAN, E.; BELFRAGE, P.; MANGANIELLO, V. C. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). **J Biol Chem**, 272: 6823-6, 1997.

DELACRETAZ, E.; HAYOZ, D.; OSTERHELD, M. C.; GENTON, C. Y.; BRUNNER, H. R.; WAEBER, B. Long-term nitric oxide synthase inhibition and distensibility of carotid artery in intact rats. **Hypertension**, 23: 967-70, 1994.

DENG, L. Y.; THIBAUT, G.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. **Clin Exp Hypertens**, 15: 527-37, 1993.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, 1411: 334-50, 1999.

DEY, N. B.; BOERTH, N. J.; MURPHY-ULLRICH, J. E.; CHANG, P. L.; PRINCE, C. W.; LINCOLN, T. M. Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells. **Circ Res**, 82: 139-46, 1998.

DICKINSON, N. T.; JANG, E. K.; HASLAM, R. J. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. **Biochem J**, 323 (Pt 2): 371-7, 1997.

- DISHY, V.; SOFOWORA, G.; HARRIS, P. A.; KANDCER, M.; ZHAN, F.; WOOD, A. J. et al. The effect of sildenafil on nitric oxide-mediated vasodilation in healthy men. **Clin Pharmacol Ther**, 70: 270-9., 2001.
- DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K.; LUSCHER, T. F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin I receptors. **J Clin Invest**, 96: 141-9, 1995.
- DUNKERLEY, H. A.; TILLEY, D. G.; PALMER, D.; LIU, H.; JIMMO, S. L.; MAURICE, D. H. Reduced phosphodiesterase 3 activity and phosphodiesterase 3A level in synthetic vascular smooth muscle cells: implications for use of phosphodiesterase 3 inhibitors in cardiovascular tissues. **Mol Pharmacol**, 61: 1033-40, 2002.
- EARDLEY, I.; CARTLEDGE, J. Tadalafil (Cialis) for men with erectile dysfunction. **Int J Clin Pract**, 56: 300-4, 2002.
- ESHIMA, K.; HIROOKA, Y.; SHIGEMATSU, H.; MATSUO, I.; KOIKE, G.; SAKAI, K. et al. Angiotensin in the nucleus tractus solitarius contributes to neurogenic hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. **Hypertension**, 36: 259-63, 2000.
- FEIL, R.; LOHMANN, S. M.; DE JONGE, H.; WALTER, U.; HOFMANN, F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. **Circ Res**, 93: 907-16, 2003.
- FELDMAN, A. M.; MCNAMARA, D. M. Reevaluating the role of phosphodiesterase inhibitors in the treatment of cardiovascular disease. **Clin Cardiol**, 25: 256-62., 2002.
- FIN, C.; DA CUNHA, C.; BROMBERG, E.; SCHMITZ, P. K.; BIANCHIN, M.; MEDINA, J. H. et al. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. **Neurobiol Learn Mem**, 63: 113-5, 1995.
- FIORINO, P. Participação dos nervos renais no curso temporal da hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese de óxido nítrico: avaliações hemodinâmicas, bioquímicas e moleculares. São Paulo, 2004. (Tese - Doutorado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina).
- FORSTERMANN, U.; MULSCH, A.; BOHME, E.; BUSSE, R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. **Circ Res**, 58: 531-8, 1986.
- FRANCIS, S. H.; TURKO, I. V.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, 65: 1-52, 2001.
- FURUYA, M.; YOSHIDA, M.; HAYASHI, Y.; OHNUMA, N.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K. et al. C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 177: 927-31, 1991.

- GARBERS, D. L. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. **Cell**, 71: 1-4, 1992.
- GARBERS, D. L.; LOWE, D. G. Guanylyl cyclase receptors. **J Biol Chem**, 269: 30741-4, 1994.
- GARDES, J.; GONZALEZ, M. F.; ALHENC-GELAS, F.; MENARD, J. Influence of sodium diet on L-NAME effects on renin release and renal vasoconstriction. **Am J Physiol**, 267: F798-804, 1994.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; BENNETT, T.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. **Br J Pharmacol**, 101: 10-2, 1990.
- GARG, U. C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, 83: 1774-7, 1989.
- GATON, D. D.; SAGARA, T.; LINDSEY, J. D.; WEINREB, R. N. Matrix metalloproteinase-1 localization in the normal human uveoscleral outflow pathway. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 40: 363-9, 1999.
- GILLIES, H. C.; ROBLIN, D.; JACKSON, G. Coronary and systemic hemodynamic effects of sildenafil citrate: from basic science to clinical studies in patients with cardiovascular disease. **Int J Cardiol**, 86: 131-41., 2002.
- GIORDANO, D.; DE STEFANO, M. E.; CITRO, G.; MODICA, A.; GIORGI, M. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. **Biochim Biophys Acta**, 1539: 16-27, 2001.
- GLOSSMANN, H.; PETRISCHOR, G.; BARTSCH, G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA). **Exp Gerontol**, 34: 305-18., 1999.
- GOLDBERG, N. D.; WALSETH, T. F.; STEPHENSON, J. H.; KRICK, T. P.; GRAFF, G. 18O-Labeling of guanosine monophosphate upon hydrolysis of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate by phosphodiesterase. **J Biol Chem**, 255: 10344-7, 1980.
- GONZALEZ, W.; FONTAINE, V.; PUEYO, M. E.; LAQUAY, N.; MESSIKA-ZEITOUN, D.; PHILIPPE, M. et al. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. **Hypertension**, 36: 103-9, 2000.
- GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, 57: 707-36, 1995.
- GROSS, S. S.; STUEHR, D. J.; AISAKA, K.; JAFFE, E. A.; LEVI, R.; GRIFFITH, O. W. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-

aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. **Biochem Biophys Res Commun**, 170: 96-103, 1990.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, 57: 737-69, 1995.

GUO, K.; ANDRES, V.; WALSH, K. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, 97: 2066-72, 1998.

HACKENTHAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D.; TAUGNER, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol Rev**, 70: 1067-116, 1990.

HAMAD, A. M.; CLAYTON, A.; ISLAM, B.; KNOX, A. J. Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 285: L973-83, 2003.

HAN, X.; SHIMONI, Y.; GILES, W. R. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. **J Gen Physiol**, 106: 45-65, 1995.

HARDMAN, J. G. Cyclic nucleotides and regulation of vascular smooth muscle. **J Cardiovasc Pharmacol**, 6: S639-45., 1984.

HARDMAN, J. G.; SUTHERLAND, E. W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **J Biol Chem**, 244: 6363-70, 1969.

HECKER, M.; CATTARUZZA, M.; WAGNER, A. H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **Gen Pharmacol**, 32: 9-16, 1999.

HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods Mol Biol**, 100: 1-32, 1998.

HERITY, N. A.; ALLEN, J. D.; SILKE, B.; ADGEY, A. A. Comparison of the ability of nicardipine, theophylline and zaprinast to restore cardiovascular haemodynamics following inhibition of nitric oxide synthesis. **Br J Pharmacol**, 112: 423-8, 1994.

HERRMANN, H. C.; CHANG, G.; KLUGHERZ, B. D.; MAHONEY, P. D. Hemodynamic effects of sildenafil in men with severe coronary artery disease. **N Engl J Med**, 342: 1622-6., 2000.

HILLE, R.; OLSON, J. S.; PALMER, G. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. **J Biol Chem**, 254: 12110-20, 1979.

HOLECYOVA, A.; TOROK, J.; BERNATOVA, I.; PECHANOVA, O. Restriction of nitric oxide rather than elevated blood pressure is responsible for alterations of vascular responses in nitric oxide-deficient hypertension. **Physiol Res**, 45: 317-21, 1996.

- HOUSLAY, M. D. Compartmentalization of cyclic AMP phosphodiesterases, signalling 'crosstalk', desensitization and the phosphorylation of Gi-2 add cell specific personalization to the control of the levels of the second messenger cyclic AMP. **Adv Enzyme Regul**, 35: 303-38, 1995.
- HOUSLAY, M. D.; ADAMS, D. R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. **Biochem J**, 370: 1-18, 2003.
- HOUSLAY, M. D.; KOLCH, W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. **Mol Pharmacol**, 58: 659-68, 2000.
- HUANG, M.; MANNING, R. D., JR.; LEBLANC, M. H.; HESTER, R. L. Overall hemodynamic studies after the chronic inhibition of endothelial-derived nitric oxide in rats. **Am J Hypertens**, 8: 358-64, 1995.
- HUNTER, T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**, 100: 113-27, 2000.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci**, 20: 132-9, 1997.
- ICHIKI, T.; USUI, M.; KATO, M.; FUNAKOSHI, Y.; ITO, K.; EGASHIRA, K. et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. **Hypertension**, 31: 342-8, 1998.
- IGNARRO, L. J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. **Pharmacol Toxicol**, 67: 1-7, 1990.
- IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem Pharmacol**, 41: 485-90, 1991.
- IGNARRO, L. J.; ADAMS, J. B.; HORWITZ, P. M.; WOOD, K. S. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **J Biol Chem**, 261: 4997-5002, 1986.
- IRIGOYEN, M. C.; MOREIRA, E. D.; CESTARI, I. A.; KRIEGER, E. M. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. **Braz J Med Biol Res**, 24: 219-22, 1991.
- ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, S.; DAVIS, J. W.; SUTHERLAND, E. W. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. **J Biol Chem**, 244: 6371-6, 1969.
- ISHIZUKA, N.; SAITO, K.; AKIMA, M.; MATSUBARA, S.; SAITO, M. Hypotensive interaction of sildenafil and nicorandil in rats through the cGMP pathway but not by K(ATP) channel activation. **Jpn J Pharmacol**, 84: 316-24, 2000.

JACKSON, G. Phosphodiesterase 5 inhibition: effects on the coronary vasculature. **Int J Clin Pract**, 55: 183-8., 2001.

JACKSON, G.; BENJAMIN, N.; JACKSON, N.; ALLEN, M. J. Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. **Am J Cardiol**, 83: 13C-20C., 1999.

JAHNSEN, T.; HEDIN, L.; KIDD, V. J.; BEATTIE, W. G.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. et al. Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. **J Biol Chem**, 261: 12352-61, 1986.

JASKI, B. E.; FIFER, M. A.; WRIGHT, R. F.; BRAUNWALD, E.; COLUCCI, W. S. Positive inotropic and vasodilator actions of milrinone in patients with severe congestive heart failure. Dose-response relationships and comparison to nitroprusside. **J Clin Invest**, 75: 643-9, 1985.

JEREMY, J. Y.; BALLARD, S. A.; NAYLOR, A. M.; MILLER, M. A.; ANGELINI, G. D. Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro. **Br J Urol**, 79: 958-63., 1997.

JIN, S. L.; SWINNEN, J. V.; CONTI, M. Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain. **J Biol Chem**, 267: 18929-39, 1992.

JOVER, B.; HERIZI, A.; VENTRE, F.; DUPONT, M.; MIMRAN, A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. **Hypertension**, 21: 944-8, 1993.

JUILFS, D. M.; SODERLING, S.; BURNS, F.; BEAVO, J. A. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 135: 67-104, 1999.

KAJI, T.; INADA, M.; YAMAMOTO, C.; FUJIWARA, Y.; KOIZUMI, F. Cyclic AMP-dependent pathway that mediates suppressive regulation of glycosaminoglycan production in cultured vascular endothelial cells. **Thromb Res**, 82: 389-97, 1996.

KANNO, S.; WU, Y. J.; LEE, P. C.; BILLIAR, T. R.; HO, C. Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation**, 104: 945-50, 2001.

KARIYA, K.; KAWAHARA, Y.; ARAKI, S.; FUKUZAKI, H.; TAKAI, Y. Antiproliferative action of cyclic GMP-elevating vasodilators in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, 80: 143-7, 1989.

KASSAB, S.; MILLER, M. T.; HESTER, R.; NOVAK, J.; GRANGER, J. P. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. **Hypertension**, 31: 315-20, 1998.

- KATZ, A. M. Cardiac ion channels. **N Engl J Med**, 328: 1244-51, 1993.
- KATZ, S. D.; BALIDEMAJ, K.; HOMMA, S.; WU, H.; WANG, J.; MAYBAUM, S. Acute type 5 phosphodiesterase inhibition with sildenafil enhances flow- mediated vasodilation in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 36: 845-51., 2000.
- KAWADA, N.; KUROKI, T.; UOYA, M.; INOUE, M.; KOBAYASHI, K. Smooth muscle alpha-actin expression in rat hepatic stellate cell is regulated by nitric oxide and cGMP production. **Biochem Biophys Res Commun**, 229: 238-42, 1996.
- KEH, D.; GERLACH, M.; KURER, I.; SEILER, S.; KERNER, T.; FALKE, K. J. et al. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 7: 615-24, 1996.
- KELM, M.; SCHRADER, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. **Circ Res**, 66: 1561-75, 1990.
- KHATSENKO, O. Interactions between nitric oxide and cytochrome P-450 in the liver. **Biochemistry (Mosc)**, 63: 833-9, 1998.
- KILO, S.; BERGHOFF, M.; HILZ, M.; FREEMAN, R. Neural and endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. **Neurology**, 54: 1246-52, 2000.
- KLONER, R. A. Novel phosphodiesterase type 5 inhibitors: assessing hemodynamic effects and safety parameters. **Clin Cardiol**, 27: I20-5, 2004.
- KLONER, R. A.; ZUSMAN, R. M. Cardiovascular effects of sildenafil citrate and recommendations for its use. **Am J Cardiol**, 84: 11N-7N., 1999.
- KNOBLICH, P. R.; FREEMAN, R. H.; VILLARREAL, D. Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. **Hypertension**, 28: 738-42, 1996.
- KOESLING, D.; BOHME, E.; SCHULTZ, G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. **Faseb J**, 5: 2785-91, 1991.
- KOJDA, G.; KOTTENBERG, K.; NIX, P.; SCHLUTER, K. D.; PIPER, H. M.; NOACK, E. Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. **Circ Res**, 78: 91-101, 1996.
- KOYAMA, H.; BORNFELDT, K. E.; FUKUMOTO, S.; NISHIZAWA, Y. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. **J Cell Physiol**, 186: 1-10., 2001.
- KOYANAGI, M.; EGASHIRA, K.; KUBO-INOUE, M.; USUI, M.; KITAMOTO, S.; TOMITA, H. et al. Role of transforming growth factor-beta1 in cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Hypertension**, 35: 86-90, 2000.

- KREJCY, K.; SCHWARZACHER, S.; RABERGER, G. Distribution and metabolism of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L-arginine methylester in canine blood in vitro. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 347: 342-5, 1993.
- KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin Exp Immunol**, 113: 147-56, 1998.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 4651-5, 1991.
- KUHLENCORDT, P. J.; GYURKO, R.; HAN, F.; SCHERRER-CROSBIE, M.; ARETZ, T. H.; HAJJAR, R. et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. **Circulation**, 104: 448-54, 2001.
- KUKREJA, R. C.; OCKAILI, R.; SALLOUM, F.; YIN, C.; HAWKINS, J.; DAS, A. et al. Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. **J Mol Cell Cardiol**, 36: 165-73, 2004.
- KUPATT, C.; WEBER, C.; WOLF, D. A.; BECKER, B. F.; SMITH, T. W.; KELLY, R. A. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 2599-609, 1997.
- KURTZ, A.; WAGNER, C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. **Am J Physiol**, 275: F849-62, 1998.
- LALA, P. K.; AL-MUTTER, N.; ORUCEVIC, A. Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice. **Int J Cancer**, 73: 371-80, 1997.
- LANGAN, T. A. Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. **Science**, 162: 579-80, 1968.
- LAYCOCK, S. K.; VOGEL, T.; FORFIA, P. R.; TUZMAN, J.; XU, X.; OCHOA, M. et al. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. **Circ Res**, 82: 1263-71, 1998.
- LEE, J.; KIM, S.; JUNG, M.; OH, Y.; KIM, S. W. Altered expression of vascular natriuretic peptide receptors in experimental hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 29: 299-303, 2002.
- LEE, P. C.; SALYAPONGSE, A. N.; BRAGDON, G. A.; SHEARS, L. L., 2ND; WATKINS, S. C.; EDINGTON, H. D. et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. **Am J Physiol**, 277: H1600-8, 1999.

- LEE, S. D.; KIM, D. S.; SHIM, T. S.; LIM, C. M.; KOH, Y.; KIM, W. S. et al. Nitric oxide and molsidomine in the management of pulmonary hypertension in Takayasu's arteritis. **Chest**, 119: 302-7, 2001.
- LEFER, A. M.; LEFER, D. J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovasc Res**, 32: 743-51, 1996.
- LEWIS, M. J.; SHAH, A. M.; SMITH, J. A.; HENDERSON, A. H. Does endocardium modulate myocardial contractile performance? **Cardioscience**, 1: 83-7, 1990.
- LI, J. S.; SCHIFFRIN, E. L. Resistance artery structure and neuroeffector mechanisms in hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthase. **Am J Hypertens**, 7: 996-1004, 1994.
- LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P.; BOERTH, N. J.; MACMILLAN-CROW, L. A.; CORNWELL, T. L. cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. **Adv Pharmacol**, 34: 305-22, 1995.
- LLOYD-JONES, D. M.; BLOCH, K. D. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. **Annu Rev Med**, 47: 365-75, 1996.
- LOESBERG, C.; VAN WIJK, R.; ZANDBERGEN, J.; VAN AKEN, W. G.; VAN MOURIK, J. A.; DE GROOT, P. G. Cell cycle-dependent inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by prostaglandin E1. **Exp Cell Res**, 160: 117-25, 1985.
- LOHMANN, S. M.; FISCHMEISTER, R.; WALTER, U. Signal transduction by cGMP in heart. **Basic Res Cardiol**, 86: 503-14., 1991.
- LOHMANN, S. M.; VAANDRAGER, A. B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, H. R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends Biochem Sci**, 22: 307-12, 1997.
- LOUGHNEY, K.; HILL, T. R.; FLORIO, V. A.; UHER, L.; ROSMAN, G. J.; WOLDA, S. L. et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Gene**, 216: 139-47, 1998.
- MACFARLAND, R. T.; ZELUS, B. D.; BEAVO, J. A. High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. **J Biol Chem**, 266: 136-42, 1991.
- MAHMUD, A.; HENNESSY, M.; FEELY, J. Effect of sildenafil on blood pressure and arterial wave reflection in treated hypertensive men. **J Hum Hypertens**, 15: 707-13., 2001.
- MALOZOWSKI, S.; SAHLROOT, J. T. Hemodynamic effects of sildenafil. **N Engl J Med**, 343: 967-8., 2000.

MANFROI, W. C.; CARAMORI, P. R.; ZAGO, A. J.; MELCHIOR, R.; ZEN, V.; ACCORDI, M. et al. Hemodynamic effects of sildenafil in patients with stable ischemic heart disease. **Int J Cardiol**, 90: 153-7, 2003.

MANGANIELLO, V. C.; DEGERMAN, E. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. **Thromb Haemost**, 82: 407-11, 1999.

MATSUOKA, H.; NISHIDA, H.; NOMURA, G.; VAN VLIET, B. N.; TOSHIMA, H. Hypertension induced by nitric oxide synthesis inhibition is renal nerve dependent. **Hypertension**, 23: 971-5, 1994.

MAURICE, D. H. Does sildenafil indirectly inhibit phosphodiesterase 3 in vascular smooth muscle? **Hypertension**, 41: e2, 2003.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G.; DUNKERLEY, H. A.; NETHERTON, S. J.; RAYMOND, D. R. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Mol Pharmacol**, 64: 533-46, 2003.

MCALLISTER-LUCAS, L. M.; HAIK, T. L.; COLBRAN, J. L.; SONNENBURG, W. K.; SEGER, D.; TURKO, I. V. et al. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, 270: 30671-9, 1995.

MCAULEY, I. W.; KIM, N. N.; MIN, K.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A. M. Intracavernosal sildenafil facilitates penile erection independent of the nitric oxide pathway. **J Androl**, 22: 623-8, 2001.

MCLAUGHLIN, M. E.; SANDBERG, M. A.; BERSON, E. L.; DRYJA, T. P. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. **Nat Genet**, 4: 130-4, 1993.

MEDINA, P.; SEGARRA, G.; MARTINEZ-LEON, J. B.; VILA, J. M.; ALDASORO, M.; OTERO, E. et al. Relaxation induced by cGMP phosphodiesterase inhibitors sildenafil and zaprinast in human vessels. **Ann Thorac Surg**, 70: 1327-31, 2000.

MEDINA, P.; SEGARRA, G.; MARTINEZ-LEON, J. B.; VILA, J. M.; OTERO, E.; LLUCH, S. Relaxation and cGMP formation in response to sildenafil and sodium nitroprusside in saphenous veins from normotensive and hypertensive patients. **Am J Hypertens**, 15: 798-802, 2002.

MEHEGAN, J. P.; MUIR, W. W.; UNVERFERTH, D. V.; FERTEL, R. H.; MCGUIRK, S. M. Electrophysiological effects of cyclic GMP on canine cardiac Purkinje fibers. **J Cardiovasc Pharmacol**, 7: 30-5, 1985.

MEHTA, P. M.; ALKER, K. J.; KLONER, R. A. Functional infarct expansion, left ventricular dilation and isovolumic relaxation time after coronary occlusion: a two-dimensional echocardiographic study. **J Am Coll Cardiol**, 11: 630-6, 1988.

MERY, P. F.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U.; FISCHMEISTER, R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 1197-201, 1991.

MERY, P. F.; PAVOINE, C.; BELHASSEN, L.; PECKER, F.; FISCHMEISTER, R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. **J Biol Chem**, 268: 26286-95, 1993.

MEZOFF, A. G.; GIANNELLA, R. A.; EADE, M. N.; COHEN, M. B. Escherichia coli enterotoxin (STa) binds to receptors, stimulates guanyl cyclase, and impairs absorption in rat colon. **Gastroenterology**, 102: 816-22, 1992.

MICHAELI, T.; BLOOM, T. J.; MARTINS, T.; LOUGHNEY, K.; FERGUSON, K.; RIGGS, M. et al. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 268: 12925-32, 1993.

MICHELAKIS, E.; TYMCHAK, W.; LIEN, D.; WEBSTER, L.; HASHIMOTO, K.; ARCHER, S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. **Circulation**, 105: 2398-403, 2002.

MICHELSON, A. D.; BENOIT, S. E.; FURMAN, M. I.; BRECKWOLDT, W. L.; ROHRER, M. J.; BARNARD, M. R. et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. **Am J Physiol**, 270: H1640-8, 1996.

MOCHIDA, H.; INOUE, H.; TAKAGI, M.; NOTO, T.; YANO, K.; 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.

MOHAN, P.; BRUTSAERT, D. L.; PAULUS, W. J.; SYS, S. U. Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. **Circulation**, 93: 1223-9, 1996.

MOHAN, P.; SYS, S. U.; BRUTSAERT, D. L. Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. **Int J Cardiol**, 50: 233-7., 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 329: 2002-12., 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, 12: 365-72, 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, 43: 109-42., 1991.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol**, 37: 2495-501, 1988.

MOORE, P. K.; AL-SWAYEH, O. A.; CHONG, N. W.; EVANS, R. A.; GIBSON, A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. **Br J Pharmacol**, 99: 408-12, 1990.

MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; HART, S. L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol**, 102: 198-202, 1991.

MORENO, H., JR.; METZE, K.; BENTO, A. C.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Res Cardiol**, 91: 248-55, 1996.

MORENO, H., JR.; PIOVESAN NATHAN, L.; PEREIRA COSTA, S. K.; METZE, K.; ANTUNES, E.; ZATZ, R. et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur J Pharmacol**, 287: 93-6, 1995.

MORENO, H.; METZE, K.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Bas Res Cardiol**, 91: 248-55, 1996.

MORENO, H.; NATHAN, L. P.; METZE, K.; COSTA, S. K. P.; ANTUNES, E.; HYSLOP, S. et al. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 25: 349-52, 1997.

MORENO JUNIOR, H.; METZE, K.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. Chronic nitric oxide blockade causes cardiac ischaemia but not cardiac hypertrophy: An experiment of four weeks in rats. **Verh Dtsch Ges Path**, 78: 459, 1994.

MOVSESIAN, M. A. Therapeutic potential of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors in heart failure. **Expert Opin Investig Drugs**, 9: 963-73, 2000.

MOVSESIAN, M. A.; ALHARETHI, R. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 as adjunct therapy for dilated cardiomyopathy. **Expert Opin Investig Drugs**, 11: 1529-36, 2002.

MUIRHEAD, G. J.; WILNER, K.; COLBURN, W.; HAUG-PIHALE, G.; ROUVIEX, B. The effects of age and renal and hepatic impairment on the pharmacokinetics of sildenafil. **Br J Clin Pharmacol**, 53 Suppl 1: 21S-30S, 2002.

MULSCH, A.; BUSSE, R. NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 341: 143-7, 1990.

MURRAY, F.; MACLEAN, M. R.; PYNE, N. J. Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. **Br J Pharmacol**, 137: 1187-94, 2002.

- NADAL-GINARD, B.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; ANVERSA, P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. **Circ Res**, 92: 139-50, 2003.
- NAKAKI, T.; NAKAYAMA, M.; KATO, R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol**, 189: 347-53, 1990.
- NAKATSU, K.; DIAMOND, J. Role of cGMP in relaxation of vascular and other smooth muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, 67: 251-62., 1989.
- NAWRATH, H. Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart? **Nature**, 267: 72-4, 1977.
- NUMAGUCHI, K.; EGASHIRA, K.; TAKEMOTO, M.; KADOKAMI, T.; SHIMOKAWA, H.; SUEISHI, K. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. **Hypertension**, 26: 957-62, 1995.
- OCKAILI, R.; SALLOUM, F.; HAWKINS, J.; KUKREJA, R. C. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283: H1263-9., 2002.
- OKERE, C. O.; KABA, H.; HIGUCHI, T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. **Neuroscience**, 71: 349-54, 1996.
- OSINSKI, M. T.; RAUCH, B. H.; SCHROR, K. Antimitogenic actions of organic nitrates are potentiated by sildenafil and mediated via activation of protein kinase A. **Mol Pharmacol**, 59: 1044-50, 2001.
- OSINSKI, M. T.; SCHROR, K. Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell-mitogenesis. **Biochem Pharmacol**, 60: 381-7, 2000.
- PACCA, S. R.; DE AZEVEDO, A. P.; DE OLIVEIRA, C. F.; DE LUCA, I. M.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. **J Cardiovasc Pharmacol**, 39: 201-7, 2002.
- PALMER, D.; TSOL, K.; MAURICE, D. H. Synergistic inhibition of vascular smooth muscle cell migration by phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 inhibitors. **Circ Res**, 82: 852-61, 1998.
- PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-6, 1988.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-6, 1987.

- PANG, D. C. Tissue and species specificity of cardiac cAMP-phosphodiesterase inhibitors. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, 25: 307-20, 1992.
- PANZA, J. A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. **Clin Cardiol**, 20: II-26-33, 1997.
- PASSARETTI, T. V.; WILCOX, B. D.; JEFFREY, J. J. Serotonin regulation of gene expression in uterine extracellular matrix: reciprocal effects on collagens and collagenase. **Mol Cell Endocrinol**, 120: 125-32, 1996.
- PEARSON, D. L.; DAWLING, S.; WALSH, W. F.; HAINES, J. L.; CHRISTMAN, B. W.; BAZYK, A. et al. Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. **N Engl J Med**, 344: 1832-8, 2001.
- PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I. Effect of long-term NO synthase inhibition on cyclic nucleotide content in rat tissues. **Physiol Res**, 45: 305-9, 1996.
- PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I.; BABAL, P. Structural alterations in the heart after long-term L-NAME and D-NAME treatment. **Gen Physiol Biophys**, 18 Suppl 1: 6-9, 1999.
- PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I.; PELOUCH, V.; BABAL, P. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. **Physiol Res**, 48: 353-62, 1999.
- PECHANOVA, O.; BERNATOVA, I.; PELOUCH, V.; SIMKO, F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. **J Mol Cell Cardiol**, 29: 3365-74, 1997.
- PERRY, M. J.; HIGGS, G. A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. **Curr Opin Chem Biol**, 2: 472-81, 1998.
- PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F.; MAYER, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **Br J Pharmacol**, 118: 1433-40, 1996.
- PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; BECK, K. F. Regulation of gene expression by nitric oxide. **Pflugers Arch**, 442: 479-86, 2001.
- PHILLIPS, B. G.; KATO, M.; PESEK, C. A.; WINNICKI, M.; NARKIEWICZ, K.; DAVISON, D. et al. Sympathetic activation by sildenafil. **Circulation**, 102: 3068-73., 2000.
- PINSKY, D. J.; PATTON, S.; MESAROS, S.; BROVKOVYCH, V.; KUBASZEWSKI, E.; GRUNFELD, S. et al. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. **Circ Res**, 81: 372-9, 1997.
- PRENDERGAST, B. D.; SAGACH, V. F.; SHAH, A. M. Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. **Circulation**, 96: 1320-9, 1997.

QIANG, M.; CHEN, Y. C.; WANG, R.; WU, F. M.; QIAO, J. T. Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. **Behav Pharmacol**, 8: 183-7, 1997.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **Br J Pharmacol**, 92: 181-7, 1987.

RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. **J Biol Chem**, 232: 1065-76, 1958.

REDMOND, E. M.; CAHILL, P. A.; HODGES, R.; ZHANG, S.; SITZMANN, J. V. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Cell Physiol**, 166: 469-79, 1996.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86: 3375-8., 1989.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol**, 101: 746-52., 1990.

REEVES, M. L.; ENGLAND, P. J. Cardiac phosphodiesterases and the functional effects of selective inhibition. In: BEAVO, J. A.; HOUSLAY, M. D. **Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action** ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc, 1990, p. 299-316.

REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Effects of sildenafil on myocardial infarct size, microvascular function, and acute ischemic left ventricular dilation. **Cardiovasc Res**, 59: 441-9, 2003.

REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. **Circulation**, 108: 239-44, 2003.

REGAN, C. P.; ADAM, P. J.; MADSEN, C. S.; OWENS, G. K. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. **J Clin Invest**, 106: 1139-47, 2000.

REMICK, D. G.; VILLARETE, L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **J Leukoc Biol**, 59: 471-5, 1996.

RHALEB, N. E.; YANG, X. P.; SCICLI, A. G.; CARRETERO, O. A. Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. **Hypertension**, 23: 865-8, 1994.

RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, 20: 298-303, 1992.

RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. **Pharmacol Rev**, 44: 479-602, 1992.

RYBALKIN, S. D.; BORNFELDT, K. E. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation. **Thromb Haemost**, 82: 424-34., 1999.

RYBALKIN, S. D.; BORNFELDT, K. E.; SONNENBURG, W. K.; RYBALKINA, I. G.; KWAK, K. S.; HANSON, K. et al. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. **J Clin Invest**, 100: 2611-21, 1997.

RYBALKIN, S. D.; RYBALKINA, I. G.; SHIMIZU-ALBERGINE, M.; TANG, X. B.; BEAVO, J. A. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. **Embo J**, 22: 469-78, 2003.

RYBALKIN, S. D.; YAN, C.; BORNFELDT, K. E.; BEAVO, J. A. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circ Res**, 93: 280-91, 2003.

SAENZ DE TEJADA, I.; ANGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; MONCADA, I.; ALLONA, A. et al. The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. **Int J Impot Res**, 13: 282-90, 2001.

SAGARA, T.; GATON, D. D.; LINDSEY, J. D.; GABELT, B. T.; KAUFMAN, P. L.; WEINREB, R. N. Topical prostaglandin F2alpha treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. **Arch Ophthalmol**, 117: 794-801, 1999.

SALT, T. E.; ZHANG, H.; MAYER, B.; BENZ, B.; BINNS, K. E.; DO, K. Q. Novel mode of nitric oxide neurotransmission mediated via S-nitroso-cysteinyl-glycine. **Eur J Neurosci**, 12: 3919-25, 2000.

SAMPAIO, R. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; MELO, S. E.; HYSLOP, S.; FRANCHINI, K. G.; LUCA, I. M. et al. Hypertension plus diabetes mimics the cardiomyopathy induced by nitric oxide inhibition in rats. **Chest**, 122: 1412-20., 2002.

SAMPSON, L. J.; HINTON, J. M.; GARLAND, C. J. Evidence for expression and function of phosphodiesterase type 5 (PDE- V) in rat resistance arteries. **Br J Pharmacol**, 132: 13-7., 2001.

SARKAR, R.; GORDON, D.; STANLEY, J. C.; WEBB, R. C. Dual cell cycle-specific mechanisms mediate the antimitogenic effects of nitric oxide in vascular smooth muscle cells. **J Hypertens**, 15: 275-83, 1997.

SARKAR, R.; MEINBERG, E. G.; STANLEY, J. C.; GORDON, D.; WEBB, R. C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, 78: 225-30, 1996.

- SARKAR, R.; WEBB, R. C. Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? A critical appraisal. **J Vasc Res**, 35: 135-42, 1998.
- SCHLOSSMANN, J.; FEIL, R.; HOFMANN, F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. **Ann Med**, 35: 21-7, 2003.
- SCHULTZ, G.; BOHME, E.; MUNSKE, K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. **Life Sci**, 8: 1323-32, 1969.
- SCHWARZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochem Pharmacol**, 62: 1153-61, 2001.
- SCHWARZACHER, S.; RABERGER, G. L-NG-nitro-arginine methyl ester in the anesthetized rabbit: venous vasomotion and plasma levels. **J Vasc Res**, 29: 290-2, 1992.
- SCOTT-BURDEN, T.; SCHINI, V. B.; ELIZONDO, E.; JUNQUERO, D. C.; VANHOUTTE, P. M. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. **Circ Res**, 71: 1088-100, 1992.
- SCOTT, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Pharmacol Ther**, 50: 123-45, 1991.
- SCOTT, J. D.; DELL'ACQUA, M. L.; FRASER, I. D.; TAVALLIN, S. J.; LESTER, L. B. Coordination of cAMP signaling events through PKA anchoring. **Adv Pharmacol**, 47: 175-207, 2000.
- SENZAKI, H.; SMITH, C. J.; JUANG, G. J.; ISODA, T.; MAYER, S. P.; OHLER, A. et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. **Faseb J**, 15: 1718-26, 2001.
- SENZAKI, H.; SMITH, C. J.; JUANG, G. J.; ISODA, T.; MAYER, S. P.; OHLER, A. et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. **Faseb J**, 15: 1718-26., 2001.
- SHAH, A. M.; MACCARTHY, P. A. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. **Pharmacol Ther**, 86: 49-86, 2000.
- SHAH, A. M.; SPURGEON, H. A.; SOLLOTT, S. J.; TALO, A.; LAKATTA, E. G. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. **Circ Res**, 74: 970-8, 1994.
- SHAKAR, S. F.; ABRAHAM, W. T.; GILBERT, E. M.; ROBERTSON, A. D.; LOWES, B. D.; ZISMAN, L. S. et al. Combined oral positive inotropic and beta-blocker therapy for treatment of refractory class IV heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 31: 1336-40, 1998.

- SHEKERDEMIAN, L. S.; RAVN, H. B.; PENNY, D. J. Interaction between inhaled nitric oxide and intravenous sildenafil in a porcine model of meconium aspiration syndrome. **Pediatr Res**, 55: 413-8, 2004.
- SIMKO, F.; MATUSKOVA, J.; LUPTAK, I.; KRAJCIROVICOVA, K.; KUCHARSKA, J.; GVOZDJAKOVA, A. et al. Effect of simvastatin on remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. **Life Sci**, 74: 1211-24, 2004.
- SINGH, J.; FLITNEY, F. W. Inotropic responses of the frog ventricle to dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo cyclic GMP and related changes in endogenous cyclic nucleotide levels. **Biochem Pharmacol**, 30: 1475-81, 1981.
- SMITH, C.; MITCHINSON, M. J.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **Biochem J**, 286 (Pt 3): 901-5, 1992.
- SMITH, C. J.; HUANG, R.; SUN, D.; RICKETTS, S.; HOEGLER, C.; DING, J. Z. et al. Development of decompensated dilated cardiomyopathy is associated with decreased gene expression and activity of the milrinone-sensitive cAMP phosphodiesterase PDE3A. **Circulation**, 96: 3116-23, 1997.
- SODERLING, S. H.; BAYUGA, S. J.; BEAVO, J. A. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95: 8991-6, 1998.
- SODERLING, S. H.; BAYUGA, S. J.; BEAVO, J. A. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J Biol Chem**, 273: 15553-8, 1998.
- SODERLING, S. H.; BEAVO, J. A. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Curr Opin Cell Biol**, 12: 174-9., 2000.
- SONNENBURG, W. K.; SEGER, D.; KWAK, K. S.; HUANG, J.; CHARBONNEAU, H.; BEAVO, J. A. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J Biol Chem**, 270: 30989-1000, 1995.
- SPEAKMAN, M. T.; KLONER, R. A. Viagra and Cardiovascular Disease. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, 4: 259-67, 1999.
- STEWART, P. M.; WHORWOOD, C. B.; VALENTINO, R.; BURT, D.; SHEPERD, M. C.; EDWARDS, R. W. 11-BETA-Hydroxysteroid Dehydrogenase activity and gene expression in the hypertensive Bianchi-Milan rat. **J Hypertension**, 11: 349-54, 1993.
- STIEF, C. G.; UCKERT, S.; BECKER, A. J.; HARRINGER, W.; TRUSS, M. C.; FORSSMANN, W. G. et al. Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. **Urology**, 55: 146-50., 2000.

- STOCKKLAUSER-FARBER, K.; BALLHAUSEN, T.; LAUFER, A.; ROSEN, P. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. **Biochim Biophys Acta**, 1535: 10-20, 2000.
- STOWE, F.; NOVALIJA, E. Phosphodiesterase type 5 inhibition enhances vasorelaxation caused by nitroprusside in guinea pig intact heart and isolated aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, 36: 162-8., 2000.
- STUART-SMITH, K.; WARNER, D. O.; JONES, K. A. The role of cGMP in the relaxation to nitric oxide donors in airway smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, 341: 225-33, 1998.
- SUGIYAMA, A.; TAKEUCHI, N.; SAEGUSA, Y.; SUGITA, M.; HASHIMOTO, K. Molecular mechanisms of cardiostimulatory effects of sildenafil. **Jpn J Pharmacol**, 88: 362-4., 2002.
- SUNAHARA, R. K.; DESSAUER, C. W.; GILMAN, A. G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 36: 461-80, 1996.
- TABRIZI-FARD, M. A.; FUNG, H. L. Pharmacokinetics, plasma protein binding and urinary excretion of N omega-nitro-L-arginine in rats. **Br J Pharmacol**, 111: 394-6, 1994.
- TAKEMOTO, M.; EGASHIRA, K.; TOMITA, H.; USUI, M.; OKAMOTO, H.; KITABATAKE, A. et al. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. **Hypertension**, 30: 1621-7, 1997.
- TAKIMOTO, E.; CHAMPION, H. C.; LI, M.; BELARDI, D.; REN, S.; RODRIGUEZ, E. R. et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. **Nat Med**, 11: 214-22, 2005.
- TAMIR, S.; TANNENBAUM, S. R. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. **Biochim Biophys Acta**, 1288: F31-6, 1996.
- TAUSSIG, R.; GILMAN, A. G. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. **J Biol Chem**, 270: 1-4, 1995.
- THARAUX, P. L.; DUSSAULE, J. C.; PAUTI, M. D.; VASSITCH, Y.; ARDAILLOU, R.; CHATZIANTONIOU, C. Activation of renin synthesis is dependent on intact nitric oxide production. **Kidney Int**, 51: 1780-7, 1997.
- THOMPSON, D. K.; GARBERS, D. L. Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. **J Biol Chem**, 270: 425-30, 1995.
- THOMPSON, W. J.; LAVIS, V. R.; WHALIN, M. E.; STRADA, S. J. Regulatory mechanisms of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, 25: 165-84, 1992.

- THORPE, D. S.; MORKIN, E. The carboxyl region contains the catalytic domain of the membrane form of guanylate cyclase. **J Biol Chem**, 265: 14717-20, 1990.
- THYBERG, J. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. **Histol Histopathol**, 13: 871-91, 1998.
- TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta**, 1411: 437-55, 1999.
- TOKUNO, S.; THOREN, P.; LOWBEER, C.; VALEN, G. The role of nitric oxide in ischaemia/reperfusion injury of isolated hearts from severely atherosclerotic mice. **Life Sci**, 69: 2067-80, 2001.
- TRAUTWEIN, W.; TANIGUCHI, J.; NOMA, A. The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. **Pflugers Arch**, 392: 307-14, 1982.
- TRAUTWEIN, W.; TRUBE, G. Negative inotropic effect of cyclic GMP in cardiac fiber fragments. **Pflugers Arch**, 366: 293-5, 1976.
- TRAVERSE, J. H.; CHEN, Y. J.; DU, R.; BACHE, R. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. **Circulation**, 102: 2997-3002., 2000.
- TROY, C. M.; DEROSI, D.; PROCHIANTZ, A.; GREENE, L. A.; SHELANSKI, M. L. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. **J Neurosci**, 16: 253-61, 1996.
- TSCHOPE, C.; SPILLMANN, F.; ALTMANN, C.; KOCH, M.; WESTERMANN, D.; DHAYAT, N. et al. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, 61: 559-69, 2004.
- TSURUMI, Y.; MUROHARA, T.; KRASINSKI, K.; CHEN, D.; WITZENBICHLER, B.; KEARNEY, M. et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. **Nat Med**, 3: 879-86, 1997.
- UCKERT, S.; HEDLUND, P.; WALDKIRCH, E.; SOHN, M.; JONAS, U.; ANDERSSON, K. E. et al. Interactions between cGMP- and cAMP-pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. **World J Urol**, 2004.
- UHLENIUS, N.; TIKKANEN, I.; TIKKANEN, T.; MIETTINEN, A.; TORNROTH, T.; FYHRQUIST, F. Chronic inhibition of nitric oxide synthase in Heymann nephritis. **Nephron**, 74: 144-9, 1996.
- UNDERWOOD, D. C.; KOTZER, C. J.; BOCHNOWICZ, S.; OSBORN, R. R.; LUTTMANN, M. A.; HAY, D. W. et al. Comparison of phosphodiesterase III, IV and dual III/IV inhibitors on bronchospasm and pulmonary eosinophil influx in guinea pigs. **J Pharmacol Exp Ther**, 270: 250-9, 1994.

- USUI, M.; ICHIKI, T.; KATOH, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. **Hypertension**, 32: 527-33, 1998.
- VAANDRAGER, A. B.; BOT, A. G.; RUTH, P.; PFEIFER, A.; HOFMANN, F.; DE JONGE, H. R. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. **Gastroenterology**, 118: 108-14, 2000.
- VALLANCE, P. Control of the human cardiovascular system by nitric oxide. **J Hum Hypertens**, 10: 377-81, 1996.
- VEERAVALLI, K. K.; AKULA, A.; KOTA, M. K. Nitric oxide- and prostaglandin-mediated cardioprotection by bradykinin in myocardial ischemia and reperfusion injury. **Pol J Pharmacol**, 55: 1021-9, 2003.
- VILA-PETROFF, M. G.; YOUNES, A.; EGAN, J.; LAKATTA, E. G.; SOLLOTT, S. J. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. **Circ Res**, 84: 1020-31, 1999.
- WAHLER, G. M.; DOLLINGER, S. J. Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. **Am J Physiol**, 268: C45-54, 1995.
- WAHLER, G. M.; SPERELAKIS, N. Intracellular injection of cyclic GMP depresses cardiac slow action potentials. **J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res**, 10: 83-95, 1985.
- WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev**, 39: 163-96., 1987.
- WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. **J Cardiovasc Pharmacol**, 12 Suppl 5: S115-8, 1988.
- WALKER, D. K.; ACKLAND, M. J.; JAMES, G. C.; MUIRHEAD, G. J.; RANCE, D. J.; WASTALL, P. et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. **Xenobiotica**, 29: 297-310., 1999.
- WALLACE, D. R.; BOOZE, R. M. Upregulation of (+)-7-hydroxy-N,N-di-n-[3H]propyl-2-aminotetralin binding following intracerebroventricular administration of a nitric oxide generator. **Neurochem Res**, 22: 163-70, 1997.
- WALLIS, R. M.; CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; ELLIS, P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. **Am J Cardiol**, 83: 3C-12C., 1999.

- WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **J Biol Chem**, 243: 3763-5, 1968.
- WARD, J. K.; BARNES, P. J.; TADJKARIMI, S.; YACOUB, M. H.; BELVISI, M. G. Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in humal trachea. **J Physiol**, 483 (Pt 2): 525-36, 1995.
- WATANABE, G.; TOMIYAMA, H.; DOBA, N. Effects of oral administration of L-arginine on renal function in patients with heart failure. **J Hypertens**, 18: 229-34, 2000.
- WEDEL, B.; HARTENECK, C.; FOERSTER, J.; FRIEBE, A.; SCHULTZ, G.; KOESLING, D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. **J Biol Chem**, 270: 24871-5, 1995.
- WHITE, A. A.; AURBACH, G. D. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. **Biochim Biophys Acta**, 191: 686-97, 1969.
- YAMADA, S. S.; SASSAKI, A. L.; FUJIHARA, C. K.; MALHEIROS, D. M.; DE NUCCI, G.; ZATZ, R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. **Hypertension**, 27: 1165-72, 1996.
- YAN, C.; ZHAO, A. Z.; BENTLEY, J. K.; LOUGHNEY, K.; FERGUSON, K.; BEAVO, J. A. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92: 9677-81, 1995.
- YANAKA, N.; KOTERA, J.; OHTSUKA, A.; AKATSUKA, H.; IMAI, Y.; MICHIBATA, H. et al. Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. **Eur J Biochem**, 255: 391-9, 1998.
- YOO, K. Y.; KIM, H. S.; MOON, J. D.; LEE, J. Sildenafil (Viagra) augments sodium nitroprusside-induced but not nitroglycerin-induced hypotension in dogs. **Anesth Analg**, 94: 1505-9, table of contents, 2002.
- YOSHIMOTO, T.; NARUSE, M.; NARUSE, K.; FUJIMAKI, Y.; TANABE, A.; MURAKI, T. et al. Gene expression of vascular natriuretic peptide receptor in the aorta of hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl**, 22: S175-6, 1995.
- ZANCHI, A.; SCHAAD, N. C.; OSTERHELD, M. C.; GROUZMANN, E.; NUSSBERGER, J.; BRUNNER, H. R. et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. **Am J Physiol**, 268: H2267-73, 1995.
- ZAPPELLINI, A.; MORENO JUNIOR, H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anesthetized dogs. **J Cardiovasc Pharmacol**, 29: 45-8, 1997.

ZATZ, R.; BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32: 958-64, 1998.

ZHAO, A. Z.; BORNFELDT, K. E.; BEAVO, J. A. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. **J Clin Invest**, 102: 869-73, 1998.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Nitric oxide and angiogenesis. **J Neurooncol**, 50: 139-48, 2000.