

HAROLDO ALFREDO FLORES TOQUE

***ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOQUÍMICOS DE VINTE
ANÁLOGOS DO SILDENAFIL EM PLAQUETAS HUMANAS,
CORPO CAVERNOSO E AORTA DE COELHO***

CAMPINAS

2008

HAROLDO ALFREDO FLORES TOQUE

***ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOQUÍMICOS DE VINTE
ANÁLOGOS DO SILDENAFIL EM PLAQUETAS HUMANAS,
CORPO CAVERNOSO E AORTA DE COELHO***

*Tese de Doutorado 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. Gilberto De Nucci

CAMPINAS

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T719e Toque, Haroldo Alfredo Flores
Estudos funcionais e bioquímicos de vinte análogos do sildenafil em plaquetas humanas, corpo cavernoso e aorta de coelho / Haroldo Alfredo Flores Toque. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Gilberto De Nucci
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sildenafil. 2. Óxido Nítrico. 3. Corpo cavernoso. 4. Aorta. 5. GMP cíclico. I. Nucci, Gilberto De. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Biochemical and functional studies of twenty sildenafil analogues in human platelets and in the rabbit corpus cavernosum and aorta

Keywords: • Sildenafil
• Nitric oxide
• Corpus cavernosum
• Aorta
• Cyclic GMP

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Prof. Dr. André Sampaio Pupo
Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Prof. Dr. Stephen Hyslop

Data da defesa: 13 -08 – 2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Handwritten signatures in black ink are present next to the names of the examiners. The signature for Prof. Dr. Gilberto de Nucci is a stylized "G. Nucci". The signature for Prof. Dr. André Sampaio Pupo is "André Sampaio Pupo". The signature for Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos is "José Eduardo Tanus dos Santos". The signature for Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini is "Kleber Franchini". The signature for Prof. Dr. Stephen Hyslop is "S. Hyslop".

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

Data: 13/08/2008

DEDICATÓRIA

A Deus, Pelas maravilhas e bênçãos que fez na minha vida.

Aos meus pais, Alfredo e Elena

*De quem Deus me deu a honra de ser filho, responsáveis pela
minha formação, meus exemplos e meus maiores incentivadores.*

Meu amor por vocês é infinito...eterno...

*A meus queridos irmãos Ruth, Elizabeth, Brayn
e meus sobrinhos Junior, Aracely e Alexandra... Pelo infinito amor e
incentivadores nesta larga caminhada... Amo muito vocês*

*A minha namorada Lenita,
Pela presença constante...Por sua dedicação e respeito Muito
obrigado meu Amor.*

*A meu eterno amigo
Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira
Não tem palavras para descrever minha gratidão por você... Foi
como um irmão para mim...Muito obrigado chefe por tudo e de
maneira especial por ter me ensinado o caminho de fazer
pesquisa.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador e amigo,
Prof. Dr. Gilberto De Nucci,
Agradeço imensamente pela acolhida, a confiança e a
oportunidade de desenvolver este trabalho, por sua
orientação e todo o crescimento profissional.*

*Ao
Prof. Dr. Edson Antunes
Agradeço pela sua amizade, co-orientação e contribuição
para o desenvolvimento de este e outros trabalhos.*

*A minha grande amiga,
Dra. Fernanda B.M. Priviero
Meu agradecimento especial pelos ensinamentos que você me
fez e por toda sua dedicação na minha vida profissional.
Serei eternamente grato...*

Agradecimentos

À Prof. Dra. Angelina Zanesco, pela amizade, e por todas as experiências compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela amizade do dia a dia e pela disponibilidade e auxílio na realização de determinados experimentos.

Agradeço aos meus queridos amigos peruanos com os que compartilhei momentos de muita alegria (Ana Cecília, Arturo, Cecília, Charo, Elvis, Flor, Gládis, Helmo, Helbert, Justo, Maria Teresa, Mário, Melchor, Richard, Rodrigo, Tony).

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Aline Maziero, Carla Penteado, Camila Moraes, Clésio Pena, Elen Landucci, Enilton Camargo, Fabiola Monica, Fernando Bau, Fernanda Dell, Ivani Souza, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Julio Rojas, Letícia Lintomen, Lineu, Márcia Cardoso, Maria Andréa Nadelbin, Mario Claudino, Priscila, Rafael Annovazzi, Rafael Prada, Raquel Lorenzetti, Rodrigo Capel, Sisi Marcondes, Tatiane Ferreira, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.

Aos funcionários do Depto. de Farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adílson e Toninho, pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva e Marcos por dispensar tanto cuidado na criação dos coelhos.

Um singelo agradecimento e o meu respeito aos coelhos, que, ainda que involuntariamente, deram suas vidas à esta pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado direito – 03/11285-4 (2004-2008)

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS	xxi
LISTA DE ABREVIACOES	xxv
LISTA DE TABELAS	xxix
LISTA DE FIGURAS	xxxiii
RESUMO.....	xxxvii
ABSTRACT.....	xli
1. INTRODUÇÃO	45
1.1. Endotelio Vascular.....	49
1.2. xido Nítrico (NO).....	51
1.2.1. Sinalização Intracelular Mediada pelo NO.....	51
1.3. Mecanismo de Relaxamento do Músculo Liso Vascular.....	52
1.3.1. Via NO/GMPc.....	52
1.3.2. Participação dos Canais de Potássio	54
1.4. Mecanismo de Contração do Músculo Liso Vascular	54
1.5. Sildenafil.....	56
1.6. Fosfodiesterases (PDEs)	60
1.7. Justificativa e Relevância para a Síntese de Análogos do Sildenafil.....	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1. Atividade Inibitória da Fosfodiesterase 5 (PDE5) <i>in vitro</i>	67
2.2. Animais	68
2.3. Preparação de Corpo Cavernoso de Coelho.....	69
2.4. Preparação de Aorta de Coelho.....	69
2.5. Banho para Corpo Cavernoso e Aorta Isolados de Coelho.....	69
2.6. Protocolos Experimentais de Corpo Cavernoso <i>in vitro</i>	70
2.7. Protocolos Experimentais de Aorta <i>in vitro</i>	70
2.7.1. Avaliação da Participação da Via NO/GMPc no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos do Sildenafil na Aorta Isolada de Coelho.....	71
2.7.2. Avaliação do Relaxamento do Sildenafil e Análogo 6r e 6u por Mecanismos Independentes do NO	72
2.7.2.1. Resposta Contrátil ao CaCl ₂	72
2.7.2.2 Participação dos Canais de Potássio	73

2.8. Análise Estatística.....	73
3. RESULTADOS.....	75
3.1. Atividade Inibitória da PDE5 em Plaquetas Humanas	77
3.2. Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil no Corpo Cavernoso de.....	
Coelho.....	79
3.3. Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil na Aorta de Coelho.....	84
3.3.1. Efeito da Remoção do Endotélio no Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil.....	84
3.4. Mecanismos de Relaxamento Dependentes da Via NO/GMPc Induzido pelos Análogos do Sildenafil na Aorta de Coelho	89
3.4.1. Efeito do L-NAME no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos	89
3.4.1.1. Anéis com endotélio íntegro.....	89
3.4.1.2. Anéis com endotélio removido.....	91
3.4.2. Efeito do ODQ no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos	93
3.4.2.1. Anéis com endotélio íntegro.....	93
3.4.2.2. Anéis com endotélio removido	96
3.4.3. Efeito do BAY 41-2272 no Relaxamento Induzido por Sildenafil e Análogos..	98
3.4.3.1. Anéis com endotélio íntegro.....	98
3.4.3.2. Anéis com endotélio removido	100
3.5. Mecanismos de Relaxamento Independentes de NO Induzido pelo Sildenafil e Análogos 6r e 6u na Aorta de Coelho.....	102
3.5.1. Efeito do sildenafil e Análogos 6r e 6u na Contração Induzida pelo CaCl ₂	102
3.5.2. Efeito dos Bloqueadores de Canal de Potássio no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos.....	104
3.5.3 Efeito da Indometacina no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil, 6r e 6u	106
3.6. Efeito do Sildenafil e Análogos no Relaxamento Induzido pelo Gliceriltrinitrato.	108
4. DISCUSSÃO	111
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
7. APÊNDICE	143

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
4-aminopiridina	Sigma (EUA)
ACh	Sigma (EUA)
Apamina	Sigma (EUA)
BAY 41-2272	Bayer Pharma Research (Wuppertal, Germany)
CaCl ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Caribdotoxina	Sigma (EUA)
DMSO	Sigma (EUA)
Fenilefrina	Sigma (EUA)
Glibenclamida	Sigma (EUA)
GTN	Sigma (EUA)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
L-NAME	Sigma (EUA)
MgSO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Nifedipino	Sigma (EUA)
ODQ	Sigma (EUA)
Sildenafil	Laboratorios Cristália (Itapira, Brasil)
Tetraetilamônio	Sigma (EUA)
Uretana	Sigma (EUA)

LISTA DE ABREVIACOES

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh: acetilcolina

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

BAY 41-2272: (5-Ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1*H*-pirazol[3,4-*b*]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina)

Ca²⁺: cálcio

CaM: calmodulina

CPA: ácido ciclopiazônico

DAG: diacilglicerol

DMSO: dimetil sulfoxido

E.P.M.: erro padrão da média

EDHF: fator de hiperpolarização derivado do endotélio

EDTA: ácido etilenodiaminotetra acético

EGTA: ácido etilenoglicol bis(2-aminoetileter) tetra acético

eNOS: sintase do óxido nítrico endotelial

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTN: gliceriltrinitrato

GTP: trifosfato de guanosina

iNOS: sintase do óxido nítrico induzível

IP₃: inositol trifosfato

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

nNOS: sintase do óxido nítrico neuronal

NANC: não adrenérgico não colinérgico

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

ODQ: 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalina-1-one

pEC₅₀: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

PE: fenilefrina

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

PKA: proteína quinase A

PKG: proteína quinase G

PLC: fosfolipase C

PRP: plasma rico em plaqueta

RS: retículo sarcoplasmático

SOC: canais operados por estoque

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito do sildenafil e análogos do sildenafil (6a-q) na atividade da PDE5 plaquetária e em corpo cavernoso. A inibição da atividade da PDE5 plaquetária está mostrada como valores de IC_{50} (μM). O efeito relaxante dos compostos em corpo cavernoso está mostrado como valores de potência (pEC_{50}) e de resposta relaxante máxima (E_{max}).....80
- Tabela 2.** Efeito do sildenafil e análogos do sildenafil (6r-v) na atividade da PDE5 plaquetária e em corpo cavernoso. A inibição da atividade da PDE5 plaquetária está mostrada como valores de IC_{50} (μM). O efeito relaxante dos compostos em corpo cavernoso está mostrado como valores de potência (pEC_{50}) e de resposta relaxante máxima (E_{max}).....82
- Tabela 3.** Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos (0,0001-10 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) ou removido (E-) pré-contraídos com fenilefrina (1 μM). O *shift* representa o deslocamento à direita provocado pela remoção do endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M para 5 experimentos.....86
- Tabela 4.** Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) do gliceriltrinitrato (GTN) em anéis de aorta com endotélio removido, na presença ou na ausência dos análogos do sildenafil. O *shift* representa o deslocamento à esquerda provocado pelo GTN.....109

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação do óxido nítrico (NO).....	50
Figura 2. Diagrama mostrando o mecanismo de ação do sildenafil.....	57
Figura 3. Estrutura química do GMPc e dos inibidores de PDE5.....	59
Figura 4. Diagrama do modelo de ação da PDE5.....	61
Figura 5. Estrutura básica dos análogos do sildenafil.....	63
Figura 6. Sistema de câmara de incubação para órgão isolado.....	
Figura 7. Efeito inibitório da PDE5 plaquetária pelo sildenafil ou análogos <i>in vitro</i>	78
Figura 8. Curvas concentração-efeito (0,001-10 μ M) ao sildenafil e análogos do sildenafil em corpo cavernoso de coelho.....	83
Figura 9. Curvas concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta isolada de coelho com endotélio íntegro ou removido.	87
Figura 10. Efeito relaxante do sildenafil e análogos do sildenafil em anéis de aorta isolada de coelho com endotélio íntegro ou removida	88
Figura 11. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos do sildenafil em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença de L-NAME (100 μ M).	90
Figura 12. Curvas concentração-efeito ao sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência ou na presença L-NAME (100 μ M).	92
Figura 13. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença de ODQ (10 μ M)..	95
Figura 14. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos aorta com endotélio removido, na ausência ou na presença de ODQ (10 μ M)..	97

Figura 15. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença de BAY 41-2272 (0,03 μ M).....	99
Figura 16. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência ou na presença de BAY 41-2272 (0,03 μ M). .	101
Figura 17. Curvas concentração-efeito ao CaCl_2 em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência e na presença de 0,1 μ M ou de 1 μ M de sildenafil, 6f, 6r, 6u, e nifedipina	103
Figura 18. Curvas concentração-efeito ao sildenafil, 6r, e 6u em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência ou na presença dos bloqueadores de canais de potássio..	105
Figura 19. Curvas concentração-efeito ao sildenafil, 6r, 6u e acetilcolina em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença da indometacina	107
Figura 20. Curva concentração-efeito ao gliceriltrinitrato em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência ou na presença do sildenafil e análogos.	110

RESUMO

O sildenafil, inibidor específico de PDE5, é utilizado no tratamento da disfunção erétil. Na procura de um inibidor mais potente e seletivo de PDE5, testamos vinte novos análogos do sildenafil (**6a-v**), caracterizados pela presença de um grupo sulfonil ou de um substituinte n'n'etilendiamina na posição do grupo metil da piperazina. Os objetivos deste trabalho foram: 1) Avaliar a atividade inibitória da PDE5 de plaquetas humanas; 2) Avaliar o efeito relaxante dos análogos do sildenafil em corpo cavernoso de coelho; 3) Avaliar o efeito relaxante dos análogos do sildenafil em anéis de aorta de coelho. Foi utilizado sangue de voluntários sadios para a atividade inibitória da PDE5 e coelhos New Zealand machos (2-3 kg) procedentes do CEMIB-UNICAMP para os estudos funcionais. Os animais foram anestesiados com uretana, o corpo cavernoso e a artéria aorta foram rapidamente removidos. O tecido cavernoso e anéis de aorta foram montados em banho para órgão isolado contendo solução de Krebs (37°C, 95% O₂ / 5% CO₂). Os tecidos foram ligados a transdutores isométricos conectados a um sistema PowerLab[®] de aquisição de dados. Nossos resultados mostraram que a atividade inibitória da PDE5 induzida pelos análogos do sildenafil em plaquetas humanas foi de maneira dependente da concentração. Os compostos **6m**, **6n** e **6q** mostraram valores elevados de IC₅₀ para inibir a PDE5 plaquetária, enquanto que os compostos **6a**, **6b**, **6d**, **6g** e **6p** produziram inibição inferior a 50%. A potência inibitória (IC₅₀) dos compostos **6c**, **6e**, **6f**, **6h**, **6i**, **6l** e **6o** foi similar ao sildenafil (IC₅₀: 0,05 µM) com valores variando entre 0,05 e 0,15 µM. Os análogos que derivaram da molécula n'n'etilendiamina (**6r**, **6s**, **6t** e **6v**) mostraram uma boa atividade inibitória com valores entre 0,20-0,51 µM. Interessantemente, o composto **6u** mostrou uma potência de 0,04 µM, o qual representou o menor valor obtido dos análogos do sildenafil. Nos estudos funcionais, todos os análogos do sildenafil, à exceção do análogo **6m**, relaxaram

preparações de corpo cavernoso de coelho de maneira dependente da concentração. Particularmente, o análogo **6f** mostrou o melhor perfil farmacológico no relaxamento, com potência similar ao sildenafil, e pode servir de base para o desenvolvimento de novos inibidores de PDE5 para o tratamento da disfunção erétil. Além disso, nossos resultados mostraram que os análogos do sildenafil produzem relaxamento dependente da concentração em anéis de aorta de coelho com endotélio íntegro ou removido. Somente o análogo **6b** e **6m** apresentaram valores de potência inferiores quando comparados ao sildenafil em tecidos com endotélio íntegro. A remoção do endotélio ou a adição do L-NAME ou do ODQ (inibidor da NO sintase e da guanilil ciclase solúvel, respectivamente) em tecidos com endotélio íntegro, provocou deslocamento à direita para o sildenafil e seus análogos, à exceção do **6r** e **6u** que não apresentaram diminuição da potência decorrente da inibição do NO, seja pela remoção do endotélio, pela inibição da NO sintase ou pela inibição da guanilil ciclase solúvel. Nossos dados também mostram que o **6r** e **6u**, em combinação com o BAY 41-2272, aumentam a potência evocada por estes análogos tanto em anéis de aorta com endotélio íntegro ou removido. O relaxamento evocado pelo sildenafil, **6r** e **6u** não envolve a participação de canais de potássio e de cálcio, nem envolve a formação de prostanóides. As respostas relaxantes destes dois análogos não foram alteradas em tecidos desprovidos de endotélio, mostrando-se independentes da via NO/GMPc. Isto sugere que estes dois análogos podem ser de particular interesse em patologias decorrentes de disfunção endotelial.

ABSTRACT

Sildenafil, a cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor, is used for the treatment of erectile dysfunction. In the search for a potent and selective PDE5 inhibitor, new sildenafil analogues (**6a-v**), characterized by the presence on the sulphonyl group in the 5' position of novel N-4-substituted piperazines or ethylenediamine moiety, were synthesized. The aim of this work was 1) To evaluate the PDE5 inhibitory activity in human platelets; 2) To evaluate the relaxing effect of sildenafil analogues in rabbit corpus cavernosum; 3) To evaluate the relaxing effect of sildenafil analogues in rabbit isolated aorta. Blood from human volunteers were collected and used for PDE5 inhibitory activity and Male New Zealand rabbit (2-3 kg) for functional studies. The rabbits were anaesthetized with urethane and sacrificed. The cavernosal tissue and aortic rings were mounted in organ bath containing Krebs solution (37°C, 95% O₂ / 5% CO₂). Each tissue was connected to an isometric transducer which was connected to a data acquisition system Powerlab[®]. Our results showed that sildenafil and its analogues concentration-dependently inhibited PDE5 activity in human platelets. Compounds **6m**, **6n** and **6q** showed higher values of IC₅₀ to inhibit PDE5 of platelets, whereas compounds **6a**, **6b**, **6d**, **6g** and **6p** did not reach 50% of inhibition. The inhibitory potency of PDE5 for **6c**, **6e**, **6f**, **6h**, **6i**, **6l** and **6o** were similar with sildenafil (IC₅₀: 0,05 µM) with values between 0,05-0,15 µM. Derived analogues from n'n' substitution showed great PDE5 inhibitory activity. Interesting, compound **6u** exhibited greater IC₅₀ value (0,04 µM). In functional studies, all sildenafil analogues with exception of **6m**, relaxed concentration-dependently rabbit corpus cavernosum. Compound **6f** exhibited great pEC₅₀ value in corpus cavernosum and could be used as base for developing new PDE5 inhibitors. Moreover, our results showed that sildenafil analogues concentration-dependently relaxed both endothelium-intact and -

denuded aortic rings with similar potency values of sildenafil. Compounds **6b** and **6m** showed lower values of potency when compared to sildenafil in endothelium intact. Endothelium denudation or addition of L-NAME or ODQ (NOS and sGC inhibitors, respectively) caused marked rightward shifts in the curve to sildenafil and its analogues, whereas the relaxation curves for **6r** and **6u** were not altered after endothelium removal or either by the NO synthase or sGC inhibition. Moreover, our data also suggest that compound **6r** and **6u** increased the potency values in combination with BAY 41-2272 in both intact and denuded endothelium. The relaxation evoked by sildenafil, **6r** and **6u** does not involve either calcium or potassium channels or prostanoids formation. The relaxing responses by these compounds were independent of NO/cGMP pathway, suggesting that these compounds may be used in several diseases involving endothelium dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

As fosfodiesterases (PDEs), enzimas que têm como principal função celular finalizar o sinal deflagrado pelos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc, controlam o grau de hidrólise destes nucleotídeos, catalisando a reação de hidrólise da união do 3-fosfoéster sobre o AMPc ou GMPc (Beavo, 1995). Isto transforma estes segundos-mensageiros em seus metabólitos inativos, os nucleotídeos 5'-AMP ou 5'-GMP (Texeira *et al.*, 1997; Torphy, 1998). Atualmente, há onze famílias de PDEs descritas as quais variam de acordo com a seqüência homológica e propriedades bioquímicas (Soderling e Beavo, 2000; Cote, 2004).

A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), enzima seletiva para GMPc, encontra-se amplamente distribuída no músculo liso vascular e não vascular, plaquetas, rins, pulmões e no corpo cavernoso, e se caracteriza por controlar a via de sinalização do GMPc/PKG, especialmente em baixas concentrações de cálcio (Rybalkin *et al.*, 2003). As principais indicações terapêuticas para o uso dos inibidores da PDE5 são a disfunção erétil e a hipertensão pulmonar idiopática, embora possam ser usados para as desordens, como hipertensão arterial sistêmica e hiperplasia prostática (Bella *et al.*, 2007). Diversos efeitos colaterais como cefaléia, rubor facial, congestão nasal, dispepsia e transtornos visuais têm sido relacionados ao uso dos inibidores da PDE5. Embora alguns destes efeitos secundários, como deficiência visual, tenham sido atribuídos à inibição da PDE6, dados recentes mostram que a retina humana contém isoformas tanto da PDE5 como da PDE6 (Foresta *et al.*, 2008).

O sildenafil, o primeiro de uma nova classe de compostos usado por via oral para o tratamento da disfunção erétil, é um inibidor potente e seletivo da PDE5. Esta PDE é a principal isoforma responsável pela degradação de GMPc no corpo cavernoso (Ballard *et*

al., 1998; Corbin e Francis, 1999), causando aumento dos níveis de GMPc, que resulta em relaxamento do músculo liso, influxo de sangue no tecido erétil e ereção peniana.

Assim, a PDE5 torna-se um alvo terapêutico de grande importância devido às numerosas publicações relativas à concepção, síntese e otimização de novos inibidores de PDE5 tais como tadalafil (Cialis™), vardenafil (Levitra™), Helleva (Cristália; Toque *et al.*, 2008a) e outros compostos que estão sob ensaios clínicos (Udenafil; Ji *et al.*, 2007). Portanto, inibidores mais potentes e mais seletivos de PDE5, administrados por via oral, podem ter grande potencial farmacológico para o tratamento da disfunção erétil e da hipertensão pulmonar. No presente trabalho, baseamo-nos na estrutura do sildenafil para testar uma série de análogos deste composto onde o grupamento metil-piperazina foi substituído por outras moléculas de cadeia alifática ou cíclica. Além disso, para investigar a importância do grupamento piperazina, esta molécula foi substituída pela n'n'-etilendiamina. Estas alterações levaram à síntese de vinte análogos do sildenafil denominados **6a-v**, os quais foram preparados por síntese tradicional e sintetizados em um micro forno. Estes vinte análogos foram investigados, quanto ao mecanismo de ação na musculatura lisa vascular de coelhos (aorta e corpo cavernoso) e plaquetas humanas.

1.1. Endotélio Vascular

Os vasos sanguíneos possuem três camadas principais, a camada adventícia (constituída de tecido elástico), a camada média (composta de células musculares lisas), e a camada íntima ou lúmen (constituída por células endoteliais). Até o século passado, o endotélio era considerado apenas um conjunto de células homogêneas, com a função única de revestir internamente os vasos sanguíneos separando o espaço intravascular do extravascular, garantindo uma superfície lisa para a corrente sanguínea. Somente a partir da década de 60, através de estudos de microscopia eletrônica, é que foi revelada a grande complexidade ultraestrutural das células endoteliais. Posteriormente, o isolamento e o cultivo *in vitro* destas células permitiram estudos detalhados de suas propriedades metabólicas e funcionais. Atualmente, sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, metabolismo e liberação de grande variedade de mediadores que regulam a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas e atividade plaquetária e leucocitária (Ignarro, 2002).

A partir dos achados por Furchgott e Zawadzky (1980), sabe-se que as células endoteliais liberam diferentes substâncias que regulam o tônus das células do músculo liso vascular. Dependendo do leito vascular, o endotélio libera uma variedade de fatores relaxantes e contráteis (Furchgott e Vanhoutte, 1989). Dentre estes fatores, encontramos o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostanóides (como a prostaciclina, o ácido epoxieicosatrienóico, o tromboxano A_2), a endotelina-1, a angiotensina II, e o ânion superóxido (O_2^-).

1.2. Óxido Nítrico (NO)

O NO está envolvido em uma série de funções no organismo, incluindo relaxamento de músculo liso e neurotransmissão no sistema nervoso central e autônomo (Moncada *et al.*, 1991; Garthwaite, 1995), sendo a maior parte de seus efeitos mediada pela estimulação direta da guanilato ciclase solúvel (GCs; Lucas *et al.*, 2000).

As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como NO sintases (NOS) e catalizam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-Arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário N^ω-hidroxi-L-arginina (Figura 1, Marletta, 1988, 1993; Marletta *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1993; Fukuto e Chaudhuri, 1995; Ignarro e Murad, 1995; Kerwin *et al.*, 1995).

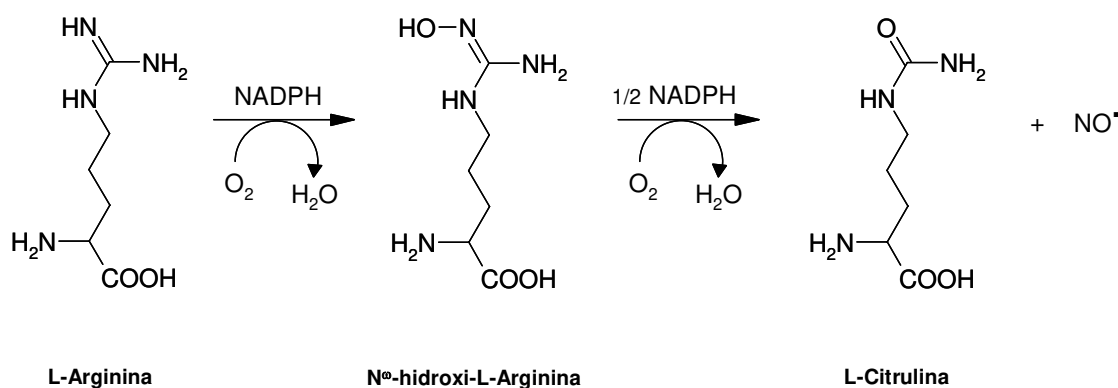


Figura 1: Formação do óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina pela ação da oxido nítrico sintase (NOS).

Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutiva (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II). As NOS constitutivas foram primeiramente caracterizadas em neurônios (NOS I ou nNOS) e em células endoteliais (NOS III ou eNOS), respectivamente, sendo reguladas pelo complexo Ca²⁺/calmodulina (CaM). Estas isoformas produzem

pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), e, neste caso, o NO parece desempenhar funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A NOS II (iNOS) foi primeiramente isolada de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e interferon- γ . Esta enzima é essencialmente cálcio (Ca^{2+})-independente e pode produzir NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão (Knowles e Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; 1998; Förstermann e Kleinert, 1995; Ignarro e Murad, 1995).

O N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) inibe todas as isoformas da NOS. Outros análogos da L-Arg, substituídos no mesmo grupamento, também são capazes de inibir a atividade da NOS. Neste caso, a inibição ocorre em graus variáveis e mecanismos distintos; porém, todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato (Mayer e Andrew, 1998; Boucher *et al.*, 1999).

1.2.1. Sinalização Intracelular Mediada pelo NO

A GCs é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e desempenha várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier e Vallance, 1989). A GCs é um heterodímero composto de subunidades α e β , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1991; Hobbs, 1997). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para a atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991).

A presença do grupo prostético heme é necessária para a ativação da GCs pelo NO (Gerzer *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1982; Ohlstein *et al.*, 1982). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode ser encontrado como Fe^{2+} (forma reduzida) ou Fe^{3+} (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His105 (Stone e Marletta, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade β_1 , determina a incapacidade da GCs de se ligar ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO (Wedel *et al.*, 1994).

O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro. Isto resulta em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs (Lucas *et al.*, 2000). Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do GTP pela GCs (Rapoport e Murad, 1983; Lucas *et al.*, 2000).

1.3. Mecanismo de Relaxamento do Músculo Liso Vascular

1.3.1. Via NO/GMPc

Uma variedade de processos fisiológicos no sistema cardiovascular, entre estes a regulação do tônus vascular, são controlados pela via do NO/GMPc (Dinerman *et al.*, 1993; Ignarro, 2002). Na regulação do tônus vascular, o NO liberado da célula endotelial reage com o ferro ferroso no grupo heme prostético da GCs, ativando esta enzima. Isto leva ao aumento da formação de GMPc, que por sua vez ativa a proteína quinase dependente de

GMPc (PKG) e relaxa a musculatura lisa vascular (Murad, 1988). Embora a via GMPc/PKG seja considerada a principal via responsável pelo relaxamento vascular induzido pelo NO, estudos mostram que o NO pode também promover relaxamento por mecanismos independentes de GMPc e/ou de PKG (Hussain *et al.*, 1997; Garland *et al.*, 1998). Desta forma, o NO é capaz de promover relaxamento vascular por mecanismos dependentes e/ou independentes da ativação da enzima GCs, dependendo do tecido biológico e da espécie animal experimentalmente utilizados. No músculo liso vascular, os mecanismos propostos para o relaxamento mediado pela via NO/GMPc incluem ativação da PKG levando à redução da concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), desfosforilação da cadeia leve de miosina e interação com o aparato contrátil, desativando o complexo Ca^{2+} -calmodulina (Karakci *et al.*, 1997). Pode ainda haver ativação dos canais de potássio levando à hiperpolarização celular (Horowitz *et al.*, 1996).

O GMPc induz relaxamento no músculo liso por dessensibilização ao aparato contrátil para o Ca^{2+} e por diminuição da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Desta forma, o GMPc poderia afetar a $[Ca^{2+}]_i$ por quatro vias diferentes: 1) redução da entrada e aumento de saída de Ca^{2+} ; 2) ativação da bomba Ca^{2+} ATPase e trocas de Na^+/Ca^{2+} ; 3) aumento de seqüestro de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS); 4) diminuição na mobilidade de Ca^{2+} através da inibição do receptor IP_3 (trifosfato de inositol) no retículo sarcoplasmático. O GMPc é rapidamente inativado e convertido a 5'GMP pela atividade dos nucleotídeos cíclicos das fosfodiesterases. Entretanto, a concentração de GMPc no músculo liso vascular depende principalmente do balanço entre a produção de GMPc pela GCs e a degradação deste pela PDE, que representa a única via de metabolismo para este segundo mensageiro (Maurice *et al.*, 2003; Rybalkin *et al.*, 2003).

1.3.2. Participação dos Canais de Potássio

A abertura dos canais de potássio facilita a hiperpolarização da membrana promovendo vasodilatação, entre outros efeitos. Quando inibidos, os canais de potássio são incapazes de transportar íons K^+ para o meio extracelular, deixando assim o interior da célula mais positivo resultando em despolarização. Ao contrário, substâncias que promovem a abertura de canais de potássio causam vasodilatação (Archer, 2002). Além disso, o GMPc pode causar hiperpolarização da membrana pela ativação de canais de potássio via proteínas quinases dependentes de GMPc (Robertson *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1993) ou da bomba de sódio.

Com base na nomenclatura farmacológica convencional, quatro diferentes tipos de canais de potássio são encontrados na maioria das células musculares lisas vasculares: (1) canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), (2) canais de potássio sensíveis ao Ca^{2+} (K_{Ca}), os quais são estimulados pelas mudanças nos níveis de Ca^{2+} intracelular, estes canais são essencialmente de baixa (SK_{Ca}) e de alta (BK_{Ca}) condutância; (3) canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), os quais respondem a mudanças metabólicas celulares; (4) canais de potássio retificador interno (K_{IR}) que medeia a elevação de K^+ intracelular em artérias de pequeno calibre.

1.4. Mecanismo de Contração do Músculo Liso Vascular

A contração no músculo liso vascular é controlada pela $[Ca^{2+}]_i$. O cálcio intracelular é armazenado particularmente no retículo sarcoplasmático (RS), que, em estado de repouso,

é de aproximadamente 100 nM, enquanto que no meio extracelular, a concentração de cálcio é cerca de 2,4 mM. É este gradiente de concentração que favorece o influxo de Ca^{2+} . Além disso, o meio intracelular é mais eletronegativo que o meio extracelular, favorecendo o influxo de Ca^{2+} (Missiaen *et al*, 1991). A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é mantida em níveis basais através de mecanismos de transporte ativo (que transportam o Ca^{2+} através da membrana plasmática) e à permeabilidade normalmente baixa da membrana plasmática e da membrana do RS ao Ca^{2+} . Assim, a regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ envolve o controle do influxo e do efluxo de Ca^{2+} e inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento do Ca^{2+} no RS.

A contração das células do músculo liso vascular inicia-se com o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que pode ocorrer através da liberação de Ca^{2+} dos estoques do RS e/ou pelo aumento do influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular. O Ca^{2+} liga-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina, ativando a enzima quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina. Esta interage com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando em uma ligação forte entre as duas proteínas (miosina-actina), levando à contração muscular. A redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desfaz o complexo Ca^{2+} -calmodulina, que inativa a MLCK e ativa a enzima fosfatase da cadeia leve de miosina, que tem como função desfosforilar a cadeia leve da miosina, promovendo assim o relaxamento muscular (Rembold, 1992; Karaki *et al.*, 1997).

O aumento no influxo de Ca^{2+} pode ocorrer por diversas vias incluindo canais de cálcio regulados por voltagem, canais regulados por ligantes, troca de Na^+ - Ca^{2+} e canais operados por estoque (SOC). Por outro lado, o efluxo de Ca^{2+} depende de uma ATPase dependente de Ca^{2+} , semelhante à ATPase dependente de Na^+/K^+ , que bombeia Na^+ para fora da célula em troca de K^+ . O cálcio pode também ser expulso das células em troca de três Na^+ por um

Ca^{2+} e, por conseguinte, produz uma corrente de hiperpolarização efetiva ao expulsar o Ca^{2+} .

O agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina caracteriza-se por aumentar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através da liberação dos estoques intracelulares de cálcio (RS) e por aumentar a permeabilidade da membrana aos íons Ca^{2+} . Este agonista interage com seu receptor promovendo a ativação da enzima fosfolipase C (PLC), que leva à hidrólise do fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (P_iP_2) da membrana plasmática formando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o IP_3 . O DAG, juntamente com os íons Ca^{2+} , ativam a proteína quinase C (PKC), formando o complexo DAG- Ca^{2+} -PKC, que promove a fosforilação de diversas proteínas intracelulares. Isto leva à fosforilação e abertura de canais de Ca^{2+} da membrana plasmática, promovendo aumento da permeabilidade da membrana para os íons Ca^{2+} . O IP_3 difunde-se através do citoplasma para se ligar a seu receptor na membrana do RS. A ativação de seu receptor promove liberação do Ca^{2+} armazenado no RS e um rápido aumento no Ca^{2+} citoplasmático, iniciando a resposta contrátil (Horowitz *et al.*, 1996).

A contração estimulada pela fenilefrina apresenta duas fases. Uma fase inicial ou contração fásica (devido à liberação de Ca^{2+} do RS) e outra de contração tônica ou mantida (ativada pela PKC que fosforila canais para Ca^{2+} da membrana plasmática estimulando o influxo de Ca^{2+} extracelular).

1.5. Sildenafil

O citrato de sildenafil, aprovado pela *Food Drug Administration* (FDA) para o tratamento oral da disfunção erétil (Ballard *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1998; Wagner, 1998), tem alta seletividade de inibição para a PDE5 (Corbin e Francis, 2002). É de amplo

conhecimento que em corpo cavernoso, o NO liberado das terminações nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) e do endotélio dos sinusóides durante estímulo sexual ativa a enzima GCs, causando, conseqüentemente, aumento na concentração intracelular de GMPc, que é prontamente hidrolisado pela PDE5. A inibição da PDE5 pelo sildenafil previne a degradação deste nucleotídeo e potencializa o relaxamento do músculo liso, aumentando o influxo arterial que leva à oclusão venosa no tecido erétil. Estes efeitos resultam na melhora da ereção peniana em indivíduos com disfunção erétil (Figura 2; Moreland *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* mostram que o sildenafil tem maior afinidade pela PDE5 em relação às outras PDEs. Esta seletividade (de aproximadamente 4000 vezes para a PDE5 versus PDE3) é importante, pois a PDE3 está envolvida no controle da contratilidade cardíaca. O sildenafil é apenas 10 vezes mais potente para a PDE5, quando comparada à PDE6, enzima encontrada na retina. Acredita-

se que esta seletividade mais baixa seja a base para efeitos adversos relacionados à visão, os quais são observados com doses ou níveis plasmáticos mais altos (Wright, 2006). Os efeitos colaterais clinicamente

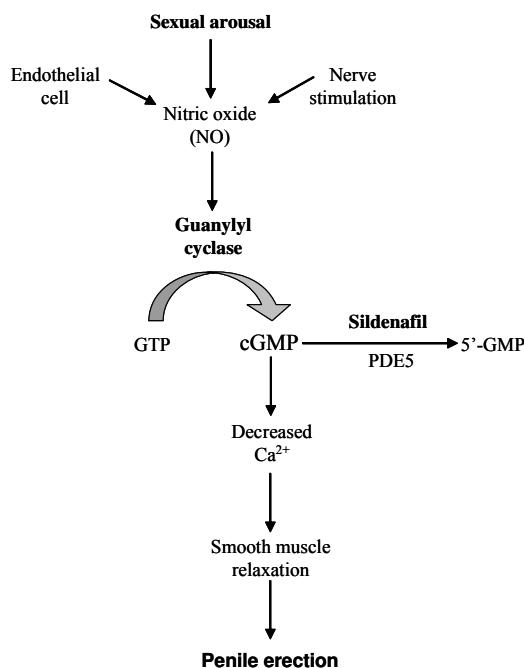


Figura 2: Diagrama mostrando o mecanismo de ação do sildenafil. Após um estímulo sexual o NO é liberado do endotélio e das terminações nervosas no corpo cavernoso do pênis. O NO interage com a GCs favorecendo a formação do GMPc através do GTP. O aumento de GMPc causa relaxamento do músculo liso cavernoso produzindo ereção do pênis. O sildenafil previne a degradação do GMPc inibindo a PDE5, aumentando os níveis de GMPc e favorecendo o relaxamento e a ereção.

importantes do sildenafil estão relacionados à inibição não-seletiva de outras PDEs, particularmente a PDE1 e a PDE6 (Beavo, 1995). Náuseas, cefaléia, congestão nasal, dispepsia, rubor facial e distúrbios visuais são os mais comuns, e dose-dependentes. O sildenafil é contra indicado em indivíduos cardiopatas que estão sob tratamento com nitratos, uma vez que a combinação de nitratos com o sildenafil resulta em hipotensão arterial grave (Goldstein *et al.*, 1998; Morales *et al.* 1998).

O Sildenafil, após administração oral é absorvido num 95%, porem é reduzido com uma biodisponibilidade absoluta de 41%, devido ao metabolismo de primeira passagem. (Nichols *et al.*, 2002). A concentração máxima no plasma é de 60 minutos, mas isso pode aumentar por mais 60 minutos se for administrado com uma refeição calórica, com redução na concentração plasmática (C_{max}) de 29%. Aproximadamente 96% do sildenafil e seus metabólitos apresentam-se ligados a proteínas plasmáticas (albumina e glicoproteínas). A ligação reversível entre o sildenafil e seu metabólitos determina a concentração livre da droga que causa seus efeitos no músculo liso por inibir sua enzima alvo. Estudos em microsomas de fígado humano mostraram que 75% do sildenafil é metabolizado pela enzima CYP3A4 e o restante pela enzima CYP2C9. O UK-103,320, metabólito principal do sildenafil, apresenta características similares ao composto de origem, com meia-vida de quatro horas (Boolell *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1997; Warrington *et al.*, 2002). Inibidores de CYP3A4 (eritromicina, ketoconazol) aumentam a concentração do sildenafil no plasma por inibir a metabolização do sildenafil.

Alem do sildenafil, o FDA aprovou em 2003 dois novos inibidores de PDE5, o vardenafil (LevitraTM) e o tadalafil (CialisTM) para ser administrados por via oral para o tratamento da disfunção erétil. Estes três inibidores apresentam estrutura muito similar ao

GMPc e competem com o substrato pelo sítio catalítico da enzima. A estrutura química do vardenafil é muito similar ao sildenafil, mas diferem com a estrutura química do tadalafil. Estas três moléculas contem um sistema de anel duplo heterocíclico nitrogenado, simulando a base purina do GMPc o qual interagem no mesmo sítio catalítico da PDE5. A diferença do vardenafil comparado com o sildenafil radica na posição do nitrogênio no grupo pirazolopirimidinona e do grupo etilo na molécula da piperazina. Estudos *in vitro* em enzima de PDE5 purificada de corpo cavernoso humano, vardenafil apresentou um menor valor de inibição de IC₅₀ (0,14 nM) comparado ao sildenafil (3,5 nM) e tadalafil (6,7 nM; Phillips *et al.*, 2002). Recentemente, o Udenafil e o Helleva (Cristália) foram relatados como novos inibidores de PDE5 (Figura 3).

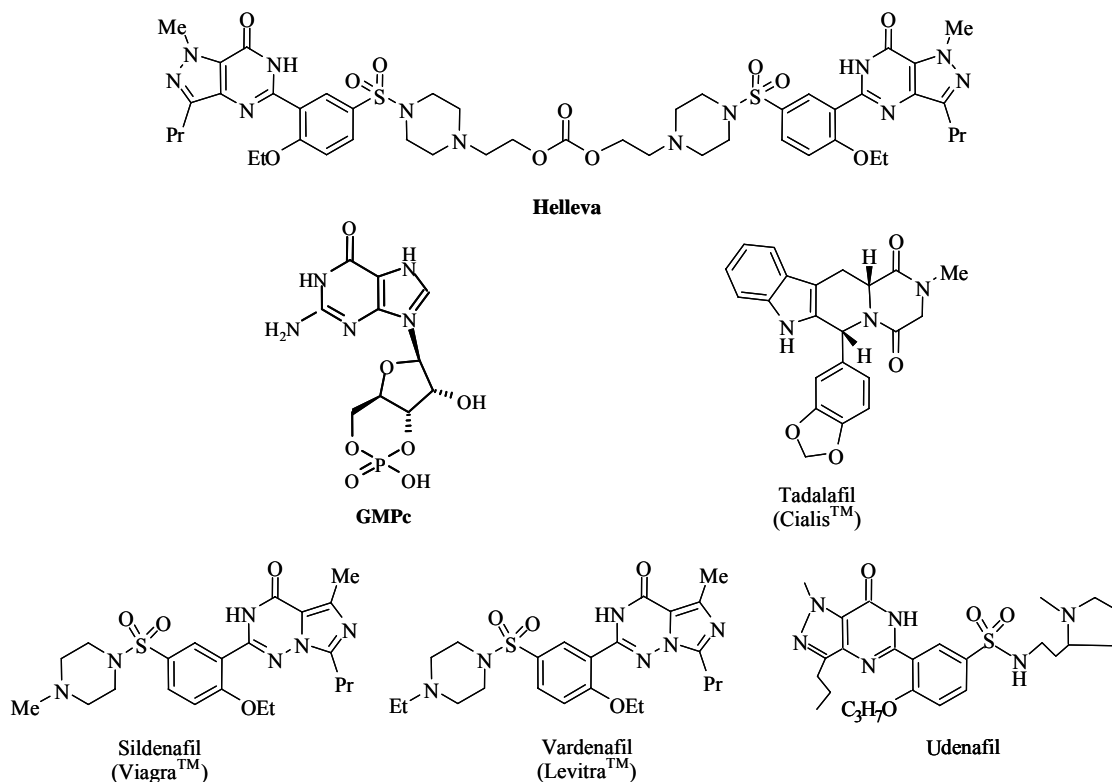


Figura 3. Estrutura química do GMPc e dos inibidores de PDE5.

1.6. Fosfodiesterases (PDEs)

As PDEs apresentam em sua estrutura três domínios funcionais: um domínio catalítico (similar entre as diferentes famílias de PDE, apresentando identidade $\geq 50\%$ dos aminoácidos), uma região N-terminal (com função de regulação em várias famílias de PDEs) e uma região C-terminal (seu papel funcional específico ainda não está claro, mas sugere-se que este domínio seja importante para a dimerização da PDE4; Rybalkin *et al.*, 2003). Estes três domínios estão conectados por regiões flexíveis, o que permite que os domínios N ou C-terminais conectem-se sobre a região catalítica, modulando o acesso do substrato a esta porção. Isto proporciona um mecanismo pelo qual os reguladores alostéricos possam incrementar ou diminuir a atividade enzimática alterando a estrutura terciária da enzima (Conti *et al.*, 1995; Torphy, 1998).

A PDE5, inicialmente identificada no pulmão e subseqüentemente purificada e clonada (Lincoln *et al.*, 1976; Francis *et al.*, 1980), está presente nas plaquetas, corpo cavernoso, células do epitélio gastrintestinal, células de purkinge do cerebelo e em níveis elevados no tecido muscular liso (Shimizu-Albergine *et al.*, 2003). É considerada a principal enzima responsável por finalizar o efeito do GMPc, gerado pela liberação do NO das terminações nervosas e das células endoteliais vasculares. Assim, os inibidores da PDE5 aumentam e prolongam o efeito do GMPc.

A PDE5 é um homodímero, sendo que cada subunidade é composta de 875 aminoácidos, e apresenta um domínio regulatório na porção amino-terminal e um domínio catalítico na porção carboxi-terminal. O domínio regulatório contém um sítio de fosforilação (ser-92), dois sítios alostéricos e uma porção do domínio de dimerização (Figura 4). O sítio de fosforilação pode ser fosforilado pela PKA ou PKG, resultando num

aumento de 50 a 70% da atividade enzimática (Corbin e Francis, 1999). Os sítios alostéricos estão ligados ao GMPc, tendo sido recentemente definidos como GAF A e GAF B (constituídos por adenil ciclase, fator de transcrição bacterial Fh1A e o GMPc). O domínio catalítico contém dois sítios de ligação para o Zn^{2+} e o sítio catalítico ligado ao GMPc. Quando o GMPc ocupa o sítio catalítico,

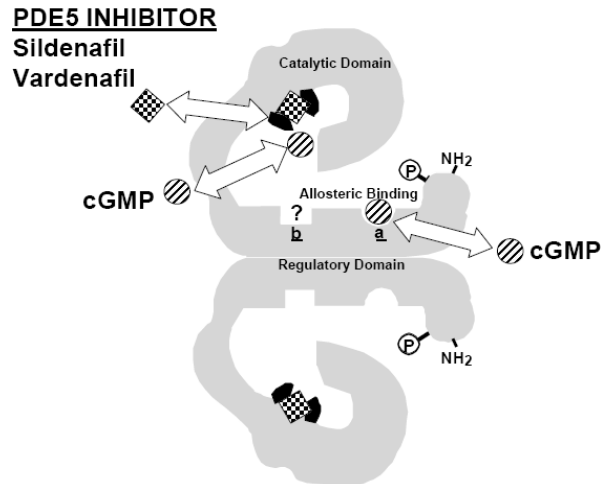


Figura 4. Diagrama do modelo de ação da PDE5 (Corbin *et al.*, 2004).

cliva o laço fosfato cíclico do GMPc, levando assim à sua forma linear inativa, o 5-GMP. A interação GMPc ou sildenafil no sítio catalítico da PDE5 estimula os sítios alostéricos, que permite a fosforilação do domínio regulatório da PDE5 pela PKG. A fosforilação da PDE5 aumenta a afinidade do sítio catalítico e do sítio alostérico para GMPc. Estas mudanças resultam em *feedback* negativo de GMPc. Isto significa que, pela elevação do GMPc, o sildenafil aumenta sua afinidade de ligação, amplificando sua eficácia (Corbin e Francis, 2002). Estudos em cristalografia demonstram que o sítio catalítico da PDE5 apresenta quatro subsítios: (1) sítio de ligação M, onde o Zn^{+} ou o Mg^{2+} vão se ligar promovendo uma melhor estabilidade; (2) sítio de ligação Q, no qual o grupo pirazolopirimidinona interage; (3) sítio hidrofóbico H, onde o grupo etoxifenil do sildenafil vai se ligar e variações nesta região são responsáveis pela seletividade aos inibidores; (4) sítio lipofílico L, onde o grupo metilpiperazina interage (Sung *et al.*, 2003). Três isoformas diferentes de PDE5 foram relatadas (A_1 , A_2 , A_3) e identificadas no cromossomo 4q26 (Loughney *et al* 1998). Estas isoformas só diferem no domínio N-terminal. A PDE5 A_1 , conhecida como

PDE específica e de ligação ao GMPc, parece estar expressa em quase todos os tecidos que contém a PDE5, sendo a PDE humana muito similar à bovina, pois contém somente 10 aminoácidos adicionais no domínio N-terminal. A PDE5 A2 contém um fragmento pequeno de aminoácidos na porção N-terminal e está presente em muitas espécies (Kotera *et al.*, 1999). A PDE5 A3 está presente somente em tecido humano (Lin *et al.*, 2000).

1.7. Justificativa e Relevância para a Síntese de Análogos do Sildenafil

Alguns autores, após uma série de análises da relação estrutura-reatividade do sildenafil, sugeriram que o fragmento 2-alcóxi contribui para a manutenção de uma coplanaridade com o grupo NH da pirimidinona o que aumentaria a atividade e especificidade da molécula (Kim *et al.*, 2001a). Outros autores sugeriram que o grupo sulfonamida (posição 5' arílico) não é essencial para atividade inibitória do sildenafil, e testaram a introdução de outros substituintes (com cadeia linear ou cíclica); os resultados foram satisfatórios quando comparados ao sildenafil (Truss e Stief, 1998; Kim *et al.*, 2001b). Além disso, a presença da cadeia alquílica no grupo pirazólico parece ser essencial para a atividade da molécula (Al-bojuk *et al.*, 2001).

Visando minimizar os efeitos adversos do sildenafil, e com a finalidade de encontrar uma molécula com melhor especificidade de inibição de PDE5, vinte análogos do sildenafil (Apêndice A) foram sintetizados pelo Departamento di Chimica Farmacêutica da Università di Napoli "Federico II". A estrutura química destes análogos foi devidamente patenteada e a apresentação destes compostos leva em consideração trabalhos previamente publicados e, obviamente, a viabilidade sintética das mesmas. O racional para o desenho destes vinte análogos do sildenafil está centrado na estrutura química ilustrada na figura 5.

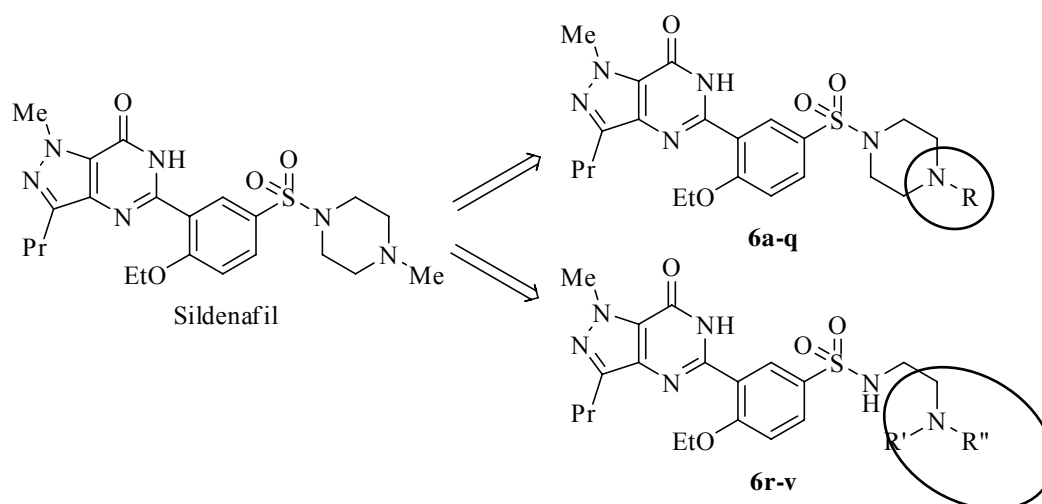


Figura 5. Estrutura básica dos análogos do sildenafil (**6a-v**).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de vinte análogos do sildenafil na inibição de PDE5 em plaquetas humanas e na reatividade da musculatura lisa vascular em corpo cavernoso e em anéis de aorta isolada de coelho.

Objetivos Específicos:

- Investigar o efeito inibitório dos análogos do sildenafil na PDE5 de plaquetas humanas.
- Investigar o relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil em corpo cavernoso de coelho, através da obtenção de curvas concentração-efeito a estes compostos.
- Investigar o relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil em anéis de aorta de coelho, através da obtenção de curvas concentração-efeito a estes compostos.
- Investigar a participação do NO endógeno, exógeno e mecanismos independentes da via NO/GMPc no relaxamento induzido pelo sildenafil e análogos **6r** e **6u** em anéis de aorta de coelho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Atividade Inibitória da Fosfodiesterase 5 (PDE5) *in vitro*

Foram utilizados 60 ml de sangue de voluntários sadios (ambos sexos, de 25 a 40 anos) coletados em 0,1 vol. citrato de sódio 3,13% e centrifugado a 200 x g, 15 min a 10°C. O plasma rico em plaqueta (PRP) foi coletado, e EDTA (10 mM) adicionado. O PRP foi centrifugado à 900 x g, 15 min à 10°C. O pellet de plaqueta foi lavado com solução nutritiva Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl, **118**; NaHCO₃, **25**; glicose, **5,6**; KCl, **4,7**; KH₂PO₄, **1,2**; MgSO₄·7H₂O, **1,17** e CaCl₂·6H₂O, **2,5**; pH 7,4) contendo 10 mM de EDTA e centrifugado novamente à 900 x g, 15 min à 10°C. As plaquetas foram ressuspensas em 3 ml de tampão Krebs contendo 0,32 M de sucrose, e a concentração de plaquetas foi ajustada para 1 x 10⁹ plaquetas/ml. Estas foram homogenizadas em sonicador de células por 10 s. A concentração protéica foi determinada através do *KIT DC Protéica Assay (BioRad)* com soro albumina bovina como padrão. A solução de fosfodiesterase foi estocada a -80°C.

A mistura padrão de reação enzimática (volume total de 200 µl) incluía 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de MgCl₂ e solução de PDE (concentração final de proteína 0,4 mg/ml).

Os agentes em estudo (sildenafil e análogos do sildenafil, denominados **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**) foram diluídos em DMSO (< 0,05% concentração final na reação) e pré-incubados na mistura enzimática por 5 min. A reação foi iniciada pela adição de GMPc (5 µM), incubado à 35°C por 30 min. A reação foi parada por aquecimento em banho de água fervente por 2 min. Após nova centrifugação (14000 rpm; 5 min), as proteínas foram precipitadas e removidas. As amostras foram mantidas à temperatura de -20°C, até análise pelo método HPLC-MS/MS.

O sistema HPLC-MS/MS era constituído por um cromatógrafo líquido modelo Shimadzu LC ADVp (Shimadzu Corporation, Japão), com auto-injetor (temperatura 6,5oC) e pré-coluna C18 Jones (1 cm x 4 mm, 4 µM) com coluna analítica Jones C18 (100 mm x 2,1 mm, 4 µM). O gradiente de eluição era composta pelas fases A (água com ácido fórmico 10 mM) e B (acetonitrila com ácido fórmico 10 mM). O gradiente iniciava com eluição isocrática (100% de A) por 2 min, seguido por 5 min de gradiente até 60% de B, era mantido fluxo de 0,35 ml/min. Tempo de corrida total de 10 min. O volume de injeção de cada amostra era de 40 µl. O sistema cromatográfico era acoplado a um espectrofotômetro de massa triplo quadrupolo modelo API 4000 (PE Sciex, Toronto, Canadá). As condições de ionização das soluções padrões de GMPc no espectrofotômetro de massa foram apresentadas no modo íon positivo, com gás de colisão desligado, com temperatura da fonte de 400oC, e voltagem da fonte 5.500 V. Com gás de colisão (nitrogênio) ligado e pressão de 7,0 psig era observado os principais fragmentos de cada molécula e pelo modo monitoramento de reação múltiplas (MRM)

2.2. Animais

Foram utilizados coelhos machos New Zealand adultos (2-3 kg) provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo CEEA_IB UNICAMP 993-1).

2.3 Preparação de Corpo Cavernoso de Coelho

Os animais foram anestesiados com uretana (1 g/kg i.v.) exsanguinados e o pênis retirado na região de inserção da crura, e imediatamente colocado em solução Krebs-Henseleit. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado removendo-se os tecidos conectivos e a túnica albugínea. O pênis de coelho forneceu quatro segmentos de corpos cavernosos dissecados (aproximadamente 1,0 x 0,3 x 0,2 cm).

2.4. Preparação de Aorta de Coelho

Para o isolamento da aorta, após anestesia com uretana (1g/kg, i.v.), os animais foram exsanguinados por punção cardíaca, e a artéria aorta foi rapidamente removida e colocada em solução de Krebs-Henseleit. Em seguida, a aorta isolada foi dissecada, removendo-se os tecidos conectivos, e então divididas em 12 anéis de aproximadamente 0,5 cm.

2.5 Banho para Corpo Cavernoso e Aorta Isolados de Coelho

Cada segmento de corpo cavernoso e anel de aorta de coelho foram montadas em câmaras de incubação de tecido (10 ml volume) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente gaseificada com O₂:CO₂ (95:5 %), mantidas à temperatura de 37 °C e pH entre 7,3 a 7,5. Os tecidos de corpo cavernosos e anéis de aorta foram suspensos entre duas pontas de metal em “L”, sendo que uma das pontas foi conectada a um transdutor de força, enquanto a outra foi fixada a uma unidade móvel, permitindo, assim, o ajuste preciso da tensão (Figura 6). Aos tecidos (corpo cavernoso e aorta) foi aplicada uma

tensão inicial de 10 mN que foi periodicamente ajustada. A solução nutritiva de Krebs foi trocada a cada 15 minutos durante o período de estabilização que compreendeu 60 minutos. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (Software versão 4,0, AD Instruments, MA)

2.6. Protocolos Experimentais de Corpo Cavernoso *in vitro*

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi adicionado ao banho, solução de KCl (80 mM) afim de se avaliar a viabilidade do tecido. Após lavagem da preparação, os tecidos foram contraídos com o agonista de adrenoreceptores α_1 fenilefrina (PE, 10 μ M). Curvas concentração-resposta foram realizadas adicionando-se sildenafil ou os análogos do sildenafil cumulativamente (0,001-10 μ M) no corpo cavernoso. Os relaxamentos foram calculados como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina.

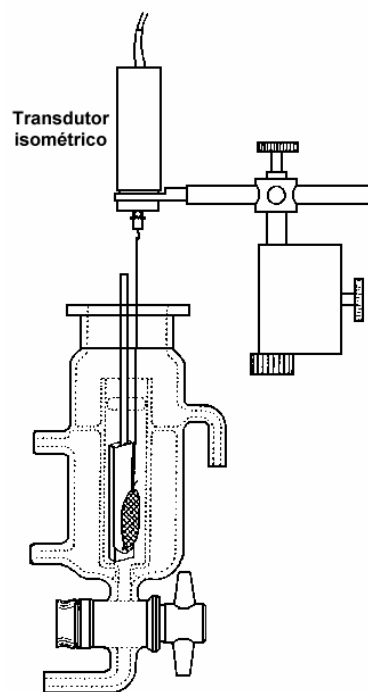


Figura 6: Sistema de câmara de incubação para órgão isolado.

2.7 Protocolos Experimentais de Aorta *in vitro*

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi adicionado ao banho, solução de KCl (80 mM) afim de se avaliar a viabilidade do tecido. Nos estudos em que se avaliou o efeito dos inibidores de PDE5 (sildenafil ou análogos do sildenafil), curvas concentração-

efeito foram construídas usando-se anéis com endotélio íntegro ou desprovidos de endotélio (removidos mecanicamente). Nos experimentos aonde o endotélio não foi removido, a integridade do mesmo foi confirmada pelo relaxamento causado pela acetilcolina (ACh, 1 μ M).

O relaxamento aos inibidores de PDE5 foi avaliado em anéis de aorta contraídos com a fenilefrina (1 μ M), que representa uma contração submáxima (70 a 80% da contração máxima). Após atingir a resposta contrátil máxima, curvas concentração-efeito aos inibidores de PDE5 (0,0001-10 μ M) foram construídas.

Também foram realizadas curvas concentração-efeito para o glicerilnitrito (GTN, 0,0001-10 μ M), na ausência e na presença dos inibidores de PDE5 (0,1 μ M). As curvas para o GTN foram obtidas em anéis de aorta desprovidos de endotélio.

2.7.1. Avaliação da Participação da Via NO/GMPc no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos do Sildenafil na Aorta Isolada de Coelho

Os anéis de aorta foram inicialmente contraídos com fenilefrina (1 μ M), conforme descrito acima. Os efeitos relaxantes do sildenafil e análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) foram investigados em tecidos com endotélio íntegro ou removido, na ausência ou na presença de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS; 100 μ M), ODQ (inibidor da GCs; 10 μ M) ou BAY 41-2272 (ativador da GCs independente de NO; 0,03 μ M). Cada inibidor ou ativador foi adicionado às cubas por 30 minutos antes de começar a curva de relaxamento. Uma curva controle ao sildenafil (ou análogos do sildenafil) foi obtida em cada segmento de aorta, e, paralelamente foram realizadas curvas concentração-resposta para cada inibidor de PDE5 na presença do inibidor ou ativador.

2.7.2. Avaliação do Relaxamento do Sildenafil e Análogo 6r e 6u por Mecanismos

Independentes do NO

2.7.2.1. Resposta Contrátil ao CaCl_2

Para a avaliação dos efeitos diretos do CaCl_2 , utilizou-se o protocolo experimental descrito por Lagaud *et al.* (1999). Inicialmente, os tecidos foram contraídos com KCl (80 mM) para determinação da contração máxima. Em seguida, a solução nutritiva de Krebs foi substituída por Krebs desprovida de cálcio, em presença de EGTA (1 mM) para a total remoção do cálcio do meio. Em seguida, foi adicionado ao banho 1 μM de fenilefrina para a remoção do cálcio do retículo sarcoplasmático. Os tecidos foram novamente lavados com Krebs desprovido de cálcio contendo EGTA, e em seguida foram incubados por 20 minutos com o inibidor da Ca^{2+} -ATPase, o ácido ciclopiazônico (CPA; 10 μM). Ao banho foram então adicionados (separadamente) os análogos do sildenafil, **6r** ou **6u**, (nas concentrações de 0,1 e 1 μM), por 30 minutos, após o qual o Krebs foi substituído por uma solução de KCl (80 mM) desprovida de cálcio. O CPA e os análogos do sildenafil foram adicionados novamente ao banho, e após 15 minutos, curvas concentração-efeito ao CaCl_2 (0,01-10 mM) foram construídas (Figura 7). Anéis de aorta desprovidos de endotélio foram utilizados para este protocolo. A curva controle ao CaCl_2 obtida na ausência dos análogos do sildenafil, foi realizada paralelamente, ou seja, em cada anel de aorta foi obtida apenas uma curva de contração ao CaCl_2 .

2.7.2.2 Participação dos Canais de Potássio

Curvas concentração-efeito foram realizadas para sildenafil, **6r** e **6u** cumulativamente (0,0001–10 μM) na aorta de coelho, na ausência e na presença de inibidores de canais de potássio, como a glibenclamida (seletiva para canais de K^+ dependentes de ATP), tetraetilamônio (bloqueador não-seletivo de canais de K^+ dependentes de voltagem e ativados por Ca^{2+}), charibdotoxina (seletiva para canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de baixa condutância) e apamina (seletiva para canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância). Todos os inibidores foram adicionados simultaneamente à mesma cuba e incubados na preparação 20 minutos antes de se adicionar a fenilefrina (1 μM) para produzir pré-contracção.

2.8. Análise Estatística

Os valores de relaxamento provocados pelo sildenafil e análogos do sildenafil no corpo cavernoso e na aorta foram calculados como percentual da contracção induzida pela fenilefrina (10 μM e 1 μM , respectivamente) as quais foram tomadas como 100%. Os valores de contracção induzidos pelo CaCl_2 na presença ou na ausência dos análogos do sildenafil foram calculados como percentual da contracção induzida pelo e o KCl (80 mM), as quais foram tomadas como 100%. Os resultados representam a média \pm erro padrão das médias (E.P.M.). Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi usado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo post hoc teste de Bonferroni. O teste *t* pareado de *Student* foi utilizado quando necessário. O programa InStat (GraphPad, version

3,00 Software, EUA) foi usado para as análises. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade Inibitória da PDE5 em Plaquetas Humanas

A adição de concentrações crescentes de sildenafil (0,005-1 μM) em solução contendo PDE5 plaquetária promoveu redução da hidrólise de GMPc de maneira concentração-dependente (Figura 7).

Nossos resultados mostraram que os compostos **6m**, **6n** e **6q** apresentaram valores IC_{50} (inibição da PDE5 plaquetária) considerados elevados (0,37, 0,32 e 0,53 μM , respectivamente). Os compostos **6a**, **6b**, **6d**, **6g** e **6p** produziram inibição inferior a 50% (Tabela 1). A potência inibitória (IC_{50}) dos compostos **6c**, **6e**, **6f**, **6h**, **6i**, **6l** e **6o** foi similar ao sildenafil (IC_{50} : 0,05 μM), com valores variando entre 0,05 e 0,15 μM (Tabela 1).

Os análogos que derivaram da molécula n'n'etilendiamina (**6r**, **6s**, **6t** e **6v**) mostraram atividade inibitória com valores de IC_{50} variando de 0,20-0,51 μM (Tabela 2). Interessantemente, o composto **6u** mostrou uma potência de 0,04 μM , que foi o menor valor obtido dentre todos os análogos do sildenafil testados.

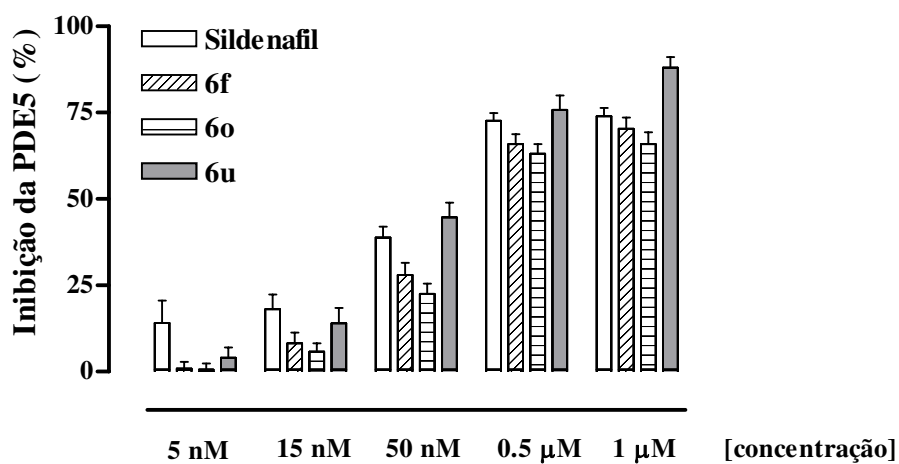
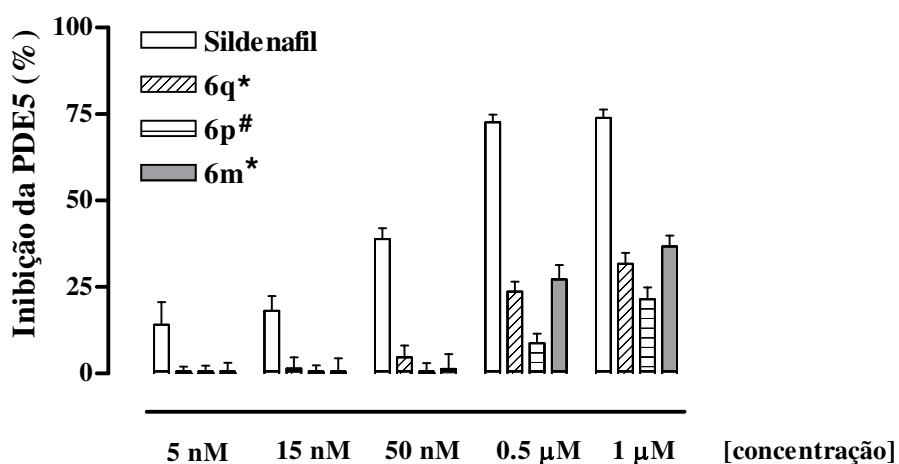
a**b**

Figura 7. Efeito inibitório da PDE5 plaquetária pelo sildenafil ou análogos *in vitro*. O painel **a** mostra a porcentagem de inibição para os análogos com ação semelhante à do sildenafil. O painel **b** mostra os análogos cuja inibição da PDE5 não alcançou 50% da atividade da PDE (valores elevados de IC_{50}). Os valores representam a média \pm E.P.M. para 4 experimentos.

não inibiu a PDE5 de plaquetas.

*apresentaram valores elevados de IC_{50} .

3.2. Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil no Corpo Cavernoso de Coelho

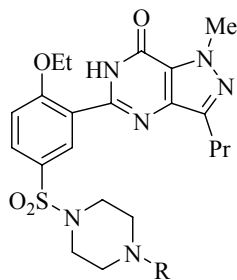
O efeito relaxante dos vinte análogos do sildenafil (0,001-10 μM ; n=4, cada) foi avaliado através da construção de curva concentração-efeito para cada um destes compostos no corpo cavernoso de coelho e comparados com o sildenafil (Figura 8).

O sildenafil promoveu um relaxamento do corpo cavernoso de coelho de maneira concentração-dependente (pEC_{50} : $6,77 \pm 0,08$), apresentando um perfil de resposta lenta e prolongada. A adição de L-NAME (100 μM) inibiu a curva concentração-efeito ao sildenafil promovendo um deslocamento significativo para a direita (4.2 vezes; n=4; $P < 0.05$), sem afetar a resposta máxima do sildenafil (Apêndice B).

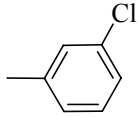
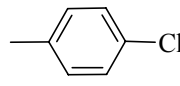
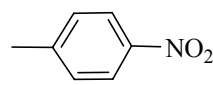
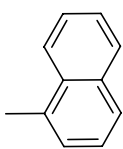
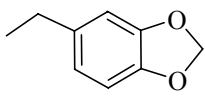
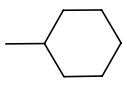
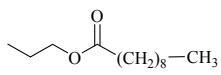
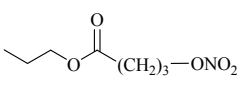
Os compostos **6a** (Figura 8a), **6c**, **6e**, **6f**, **6n**, **6o** e **6p** apresentaram potência similar à do sildenafil com valores de potência entre 6,36 e 7,08. Particularmente, o análogo **6f** foi o mais potente (pEC_{50} : $7,08 \pm 0,09$; Figura 8b) quando comparado aos outros análogos. Em contrapartida, os compostos **6b**, **6d** (Figura 8c), **6g** (Figura 8d), **6h**, **6i**, **6l** e **6q** foram significativamente menos potentes quando comparados ao sildenafil. No entanto, a resposta máxima para estes compostos (E_{max} : 96-123%) foi similar à do sildenafil (E_{max} : $105 \pm 3\%$), com exceção do análogo **6h** que apresentou uma resposta máxima diferente do sildenafil. As tabelas 1 e 2 mostram os valores de potência e de resposta máxima para estes compostos.

Os análogos que derivaram da molécula n'n'etilendiamina (**6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**) apresentaram potência significativamente menor e resposta máxima menor, quando comparados ao sildenafil. As figuras 8e e 8f mostram o relaxamento para os análogos **6r** e **6s**. As figuras para os outros análogos estão mostrados nos gráficos do Apêndice B.

Tabela 1. Efeito do sildenafil e análogos do sildenafil (**6a-q**) na atividade da PDE5 plaquetária e em corpo cavernoso. A inibição da atividade da PDE5 plaquetária está mostrada como valores de IC₅₀ (μM). O efeito relaxante dos compostos em corpo cavernoso está mostrado como valores de potência (pEC₅₀) e de resposta relaxante máxima (E_{max}).

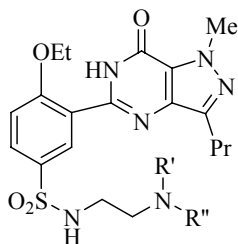


Análogos	R	IC ₅₀ (μM)	pEC ₅₀ [†]	E _{max} [†]	ClogP
6a		††	6,83 ± 0,15	113 ± 3	5,77
6b		††	6,16 ± 0,15*	119 ± 11	5,70
6c		0,15	6,62 ± 0,04	119 ± 8	5,79
6d		††	6,06 ± 0,23*	96 ± 7	6,95
6e		0,06	6,52 ± 0,08	119 ± 2	5,63
6f		0,07	7,08 ± 0,09	105 ± 3	6,08
6g		††	5,55 ± 0,15**	100 ± 3	6,09

6h		0,10	$5,68 \pm 0,15^{**}$	$75 \pm 5^*$	6,65
6i		0,14	$6,14 \pm 0,05^*$	97 ± 1	6,65
6l		0,05	$6,25 \pm 0,10^*$	112 ± 3	5,87
6m		0,37	##	##	6,94
6n		0,32	$6,36 \pm 0,06$	100 ± 8	5,14
6o		0,07	$6,57 \pm 0,10$	105 ± 2	5,79
6p		††	$6,86 \pm 0,06$	108 ± 3	8,41
6q		0,53	$6,14 \pm 0,08^*$	123 ± 2	4,87
Sildenafil	-CH ₃	0,05	$6,77 \pm 0,08$	105 ± 3	3,85

† Os valores experimentais foram calculados como percentual da contração induzida pela fenilefrina (10 μM), o qual é representado como logaritmo negativo da concentração. CloP= Coeficiente de partição octanol/água. †† não conseguiram inibir o 50% da PDE5 plaquetária; ## não conseguiram relaxar o corpo cavernoso de coelho; *P<0,05 e **P<0,01, comparados com o valor do sildenafil.

Tabela 2. Efeito do sildenafil e análogos do sildenafil (**6r-v**) na atividade da PDE5 plaquetária e em corpo cavernoso. A inibição da atividade da PDE5 plaquetária está mostrada como valores de IC₅₀ (μM). O efeito relaxante dos compostos em corpo cavernoso está mostrado como valores de potência (pEC₅₀) e de resposta relaxante máxima (E_{max}).



Análogos	R'	R''	IC ₅₀ (μM)	pEC ₅₀ [†]	E _{max} [†]	ClogP
6r	H		0,20	6,26 ± 0,15*	69 ± 4**	4,78
6s	H		0,51	6,11 ± 0,17*	51 ± 5***	5,95
6t		H	0,50	5,73 ± 0,22**	61 ± 5**	0,59
6u			0,04	5,72 ± 0,20**	60 ± 5**	4,07
6v			0,31	5,79 ± 0,16**	68 ± 6**	3,76
Sildenafil	-CH ₃	-	0,05	6,77 ± 0,08	105 ± 3	3,85

[†] Os valores experimentais foram calculados como percentual da contração induzida pela fenilefrina, o qual é representado como logaritmo negativo da concentração. CloP= Coeficiente de partição octanol/água. *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001, comparados com o valor do sildenafil.

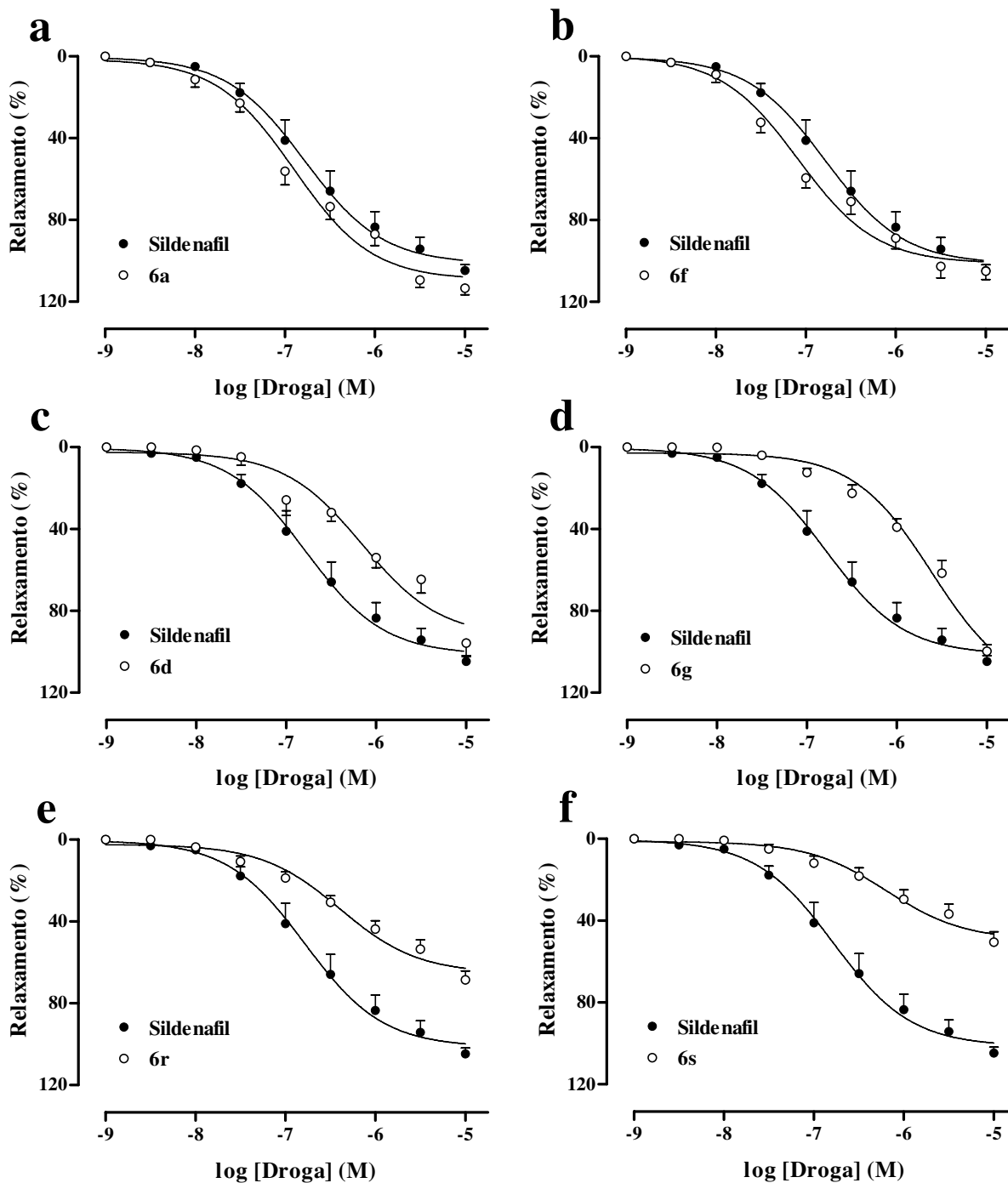


Figura 8. Curvas concentração-efeito (0,001–10 μM ; $n=4$) ao sildenafil e análogos do sildenafil em corpo cavernoso de coelho. Os valores representam médias \pm E.P.M. de relaxamento calculadas em relação ao tônus induzido pela fenilefrina (10 μM). A curva ao sildenafil foi repetida em cada painel para facilitar a comparação dos compostos.

3.3. Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil na Aorta de Coelho

3.3.1. Efeito da Remoção do Endotélio no Relaxamento Induzido pelos Análogos do Sildenafil

O efeito relaxante dos vinte análogos do sildenafil **6a-v** (0,0001-10 μ M) foram avaliados através da construção de curvas concentração-efeito a cada um destes compostos (e comparados com o sildenafil) em anéis de aorta com endotélio íntegro ou removido.

A figura 9a mostra que, em anéis de aorta com endotélio íntegro, o sildenafil produziu relaxamento concentração-dependente, cuja resposta máxima foi de $76 \pm 8\%$ e a pEC_{50} de $7,25 \pm 0,07$. O relaxamento máximo provocado pelos análogos do sildenafil (**6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**) foi similar ao relaxamento produzido pelo sildenafil (Tabela 3). A potência dos análogos do sildenafil não foi diferente da potência do sildenafil. Em contraste aos outros compostos, a potência dos análogos **6b** e **6m** foi menor quando comparada à sildenafil em tecidos com endotélio íntegro (pEC_{50} : $6,80 \pm 0,14$ e $6,81 \pm 0,19$, respectivamente, para **6b** e **6m**).

Comparados aos respectivos controles com endotélio íntegro, a remoção do endotélio reduziu significativamente a resposta máxima tanto para o sildenafil ($56 \pm 1\%$) quanto para os compostos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6o** e **6p**. Em contrapartida, a resposta máxima dos compostos **6n**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v** não foram alteradas após a retirada do endotélio ($61 \pm 4\%$, $88 \pm 3\%$, $82 \pm 3\%$, $66 \pm 7\%$, $69 \pm 5\%$, $68 \pm 7\%$, $51 \pm 5\%$, respectivamente, para **6n**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**; Figura 10b). Além disso, a remoção do endotélio provocou diminuição significativa da potência do sildenafil e dos análogos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6s**, **6t** e **6v**, comparados aos seus

respectivos controles, na presença de endotélio íntegro (Figura 10a). Em contrapartida, a remoção do endotélio não alterou a potência do análogo **6r** e **6u**, comparados às curvas dos mesmos análogos em anéis com endotélio íntegro (Figura 9e e 9f).

A figura 9b, 9c e 9d mostra o efeito relaxante dos análogos do sildenafil na aorta de coelho. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice C.

Tabela 3. Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos (0,0001-10 µM) em anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) ou removido (E-) pré-contraídos com fenilefrina (1 µM). O *shift* representa o deslocamento à direita provocado pela remoção do endotélio. Os dados representam a média ± E.P.M para 5 experimentos.

Análogos	pEC ₅₀	E _{max} (%)	Análogos	pEC ₅₀	E _{max} (%)
6a	E+ 7,18 ± 0,17	59 ± 3 [#]	6m	E+ 6,81 ± 0,19 [#]	66 ± 2
	E- 6,74 ± 0,22* <i>Shift: 3</i>	41 ± 3*		E- 6,42 ± 0,26* <i>Shift: 3</i>	42 ± 2*
6b	E+ 6,80 ± 0,14 [#]	69 ± 9	6n	E+ 7,18 ± 0,14	72 ± 4
	E- 6,48 ± 0,20* <i>Shift: 3</i>	49 ± 4*		E- 6,69 ± 0,11* <i>Shift: 3</i>	61 ± 4
6c	E+ 7,16 ± 0,17	63 ± 8	6o	E+ 7,32 ± 0,09	91 ± 5
	E- 6,54 ± 0,31* <i>Shift: 4</i>	40 ± 4*		E- 6,64 ± 0,10* <i>Shift: 5</i>	60 ± 4*
6d	E+ 7,22 ± 0,08	86 ± 1	6p	E+ 7,46 ± 0,06	93 ± 2
	E- 6,78 ± 0,11* <i>Shift: 3</i>	70 ± 3*		E- 6,68 ± 0,10* <i>Shift: 6</i>	72 ± 6*
6e	E+ 7,28 ± 0,10	90 ± 4	6q	E+ 7,04 ± 0,09	87 ± 3
	E- 6,68 ± 0,09* <i>Shift: 4</i>	75 ± 5*		E- 6,54 ± 0,07* <i>Shift: 3</i>	88 ± 3
6f	E+ 7,28 ± 0,10	89 ± 3	6r	E+ 7,21 ± 0,10	82 ± 4
	E- 6,71 ± 0,10* <i>Shift: 4</i>	67 ± 4*		E- 7,01 ± 0,11 <i>Shift:</i>	82 ± 3
6g	E+ 7,40 ± 0,06	91 ± 4	6s	E+ 7,28 ± 0,11	70 ± 5
	E- 6,76 ± 0,10* <i>Shift: 4</i>	73 ± 4*		E- 6,75 ± 0,11* <i>Shift: 3</i>	66 ± 7
6h	E+ 7,02 ± 0,14	66 ± 6	6t	E+ 7,21 ± 0,10	73 ± 3
	E- 6,49 ± 0,14* <i>Shift: 3</i>	47 ± 3*		E- 6,73 ± 0,11* <i>Shift: 5</i>	69 ± 5
6i	E+ 7,08 ± 0,13	74 ± 6	6u	E+ 6,93 ± 0,12	75 ± 5
	E- 6,61 ± 0,12* <i>Shift: 3</i>	52 ± 6*		E- 6,81 ± 0,09 <i>Shift: -</i>	68 ± 7
6l	E+ 7,18 ± 0,14	77 ± 3	6v	E+ 7,07 ± 0,15	69 ± 8
	E- 6,48 ± 0,22* <i>Shift: 3</i>	46 ± 4*		E- 6,47 ± 0,19* <i>Shift: 3</i>	51 ± 5
Sildenafil	E+ 7,25 ± 0,07	76 ± 6			
	E- 6,57 ± 0,11* <i>Shift: 5</i>	56 ± 1*			

*P<0,05, comparado com o respectivo análogo em anéis E+; [#]P<0,05, comparado com o valor do sildenafil em E+.

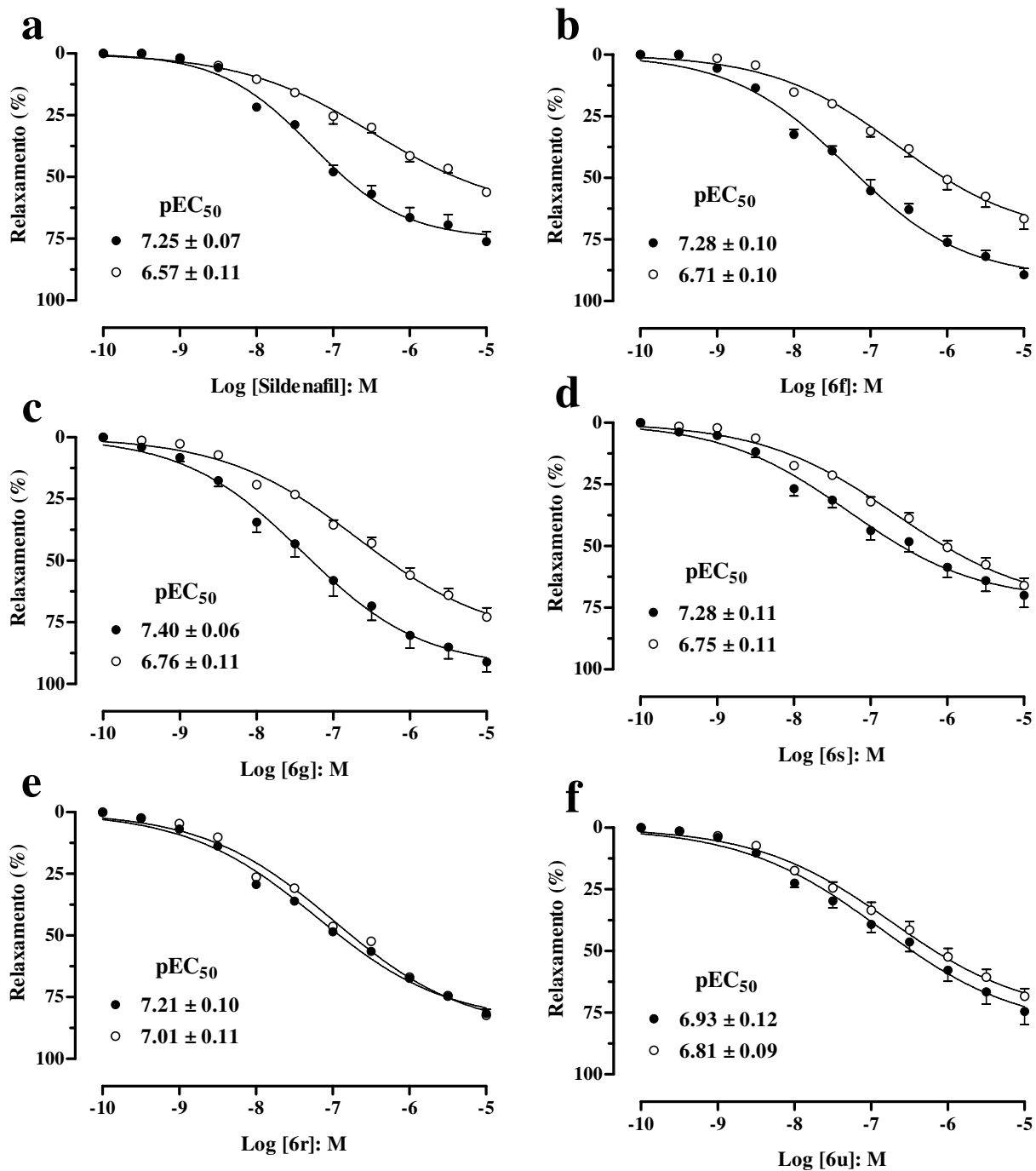


Figura 9. Curvas concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta isolada de coelho com endotélio íntegro (●) ou removido (○). Os valores representam médias \pm E.P.M. para 5 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

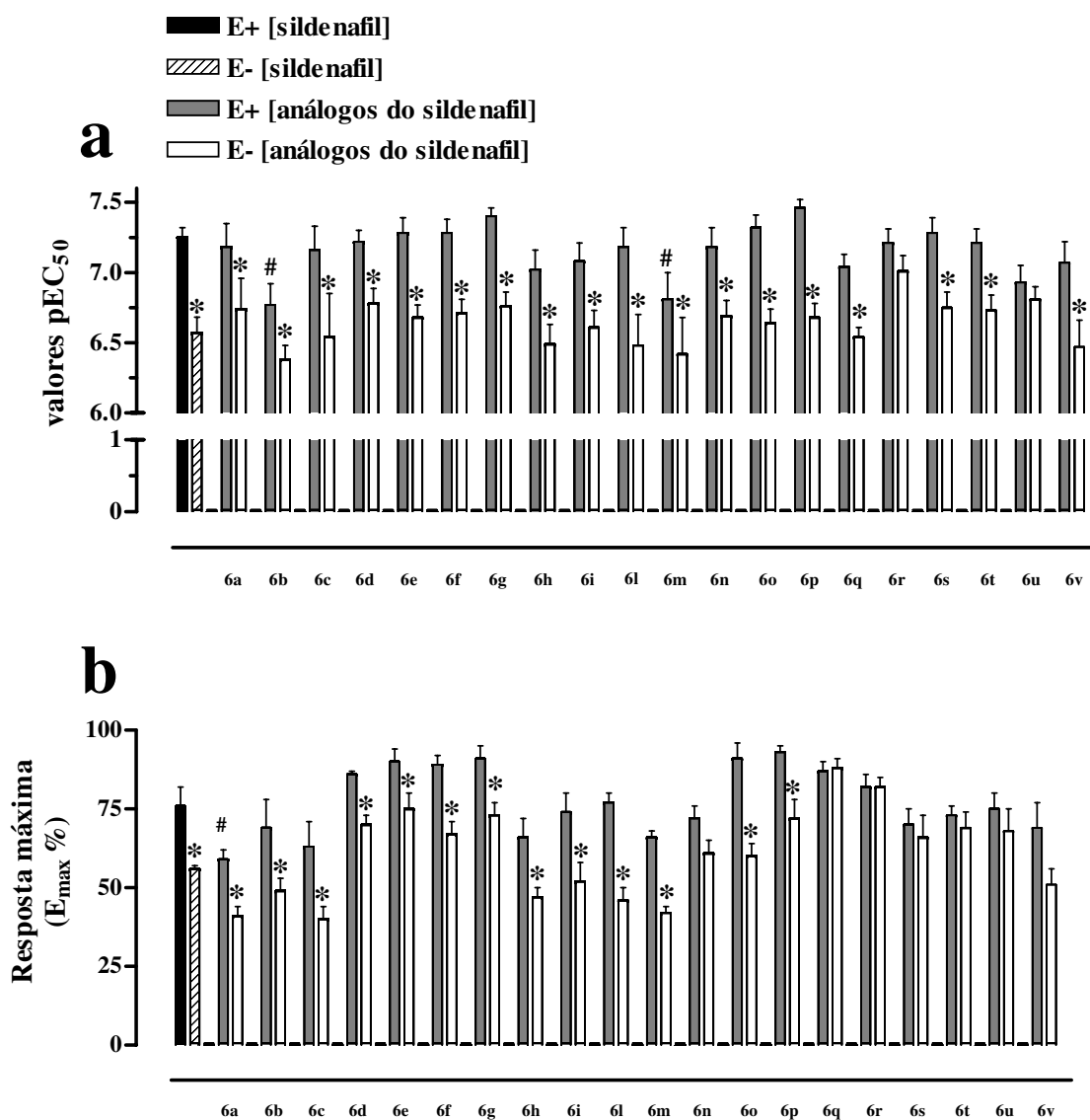


Figura 10. Efeito relaxante do sildenafil e análogos do sildenafil (pEC₅₀, painel **a** e E_{max}, painel **b**) em anéis de aorta isolada de coelho com endotélio íntegro (E+) ou removida (E-). Os valores representam médias ± E.P.M de relaxamento calculadas em relação ao tônus induzido pela fenilefrina (1 μM).

*P<0,05, quando comparado com o respectivo análogo em anéis E+;

#P<0,05, quando comparado com o valor do sildenafil em E+.

3.4. Mecanismos de Relaxamento Dependentes da Via NO/GMPc Induzido pelos Análogos do Sildenafil na Aorta de Coelho

3.4.1. Efeito do L-NAME no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos

3.4.1.1. Anéis com endotélio íntegro

As curvas ao sildenafil e seus análogos foram construídas em anéis de aorta com endotélio íntegro, na presença do L-NAME (100 μ M). A adição do L-NAME promoveu redução significativa da resposta máxima do sildenafil (de $76 \pm 8\%$ para $49 \pm 5\%$), e de seus análogos **6a** ($59 \pm 3\%$ para $41 \pm 5\%$), **6b** ($69 \pm 9\%$ para $51 \pm 2\%$), **6d** ($86 \pm 1\%$ para $71 \pm 4\%$), **6e** ($90 \pm 4\%$ para $62 \pm 4\%$), **6f** ($89 \pm 3\%$ para 66 ± 2), **6i** ($74 \pm 6\%$ para 47 ± 4), **6l** ($77 \pm 3\%$ para $58 \pm 2\%$), **6m** (66 ± 2 para 49 ± 2), **6o** ($91 \pm 5\%$ para $64 \pm 4\%$), **6p** ($93 \pm 2\%$ para $65 \pm 4\%$). Além disso, na presença do L-NAME, a potência do sildenafil e dos análogos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6s**, **6t** e **6v** foi significativamente reduzida comparados com os respectivos controles na ausência do L-NAME. Em contrapartida, os relaxamentos induzidos pelos análogos **6r** e **6u** não foram reduzidos na presença do L-NAME (pEC_{50} : $7,21 \pm 0,10$; $6,93 \pm 0,12$, na ausência e $7,11 \pm 0,10$; $6,75 \pm 0,12$, na presença do L-NAME, respectivamente para **6r** e **6u**; Figura 11e e 11f).

A figura 11b, 11c e 11d mostra o efeito relaxante dos análogos sildenafil na ausência e na presença do L-NAME na aorta de coelho. Os valores de potência e de resposta máxima estão apresentados no Apêndice D. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice E.

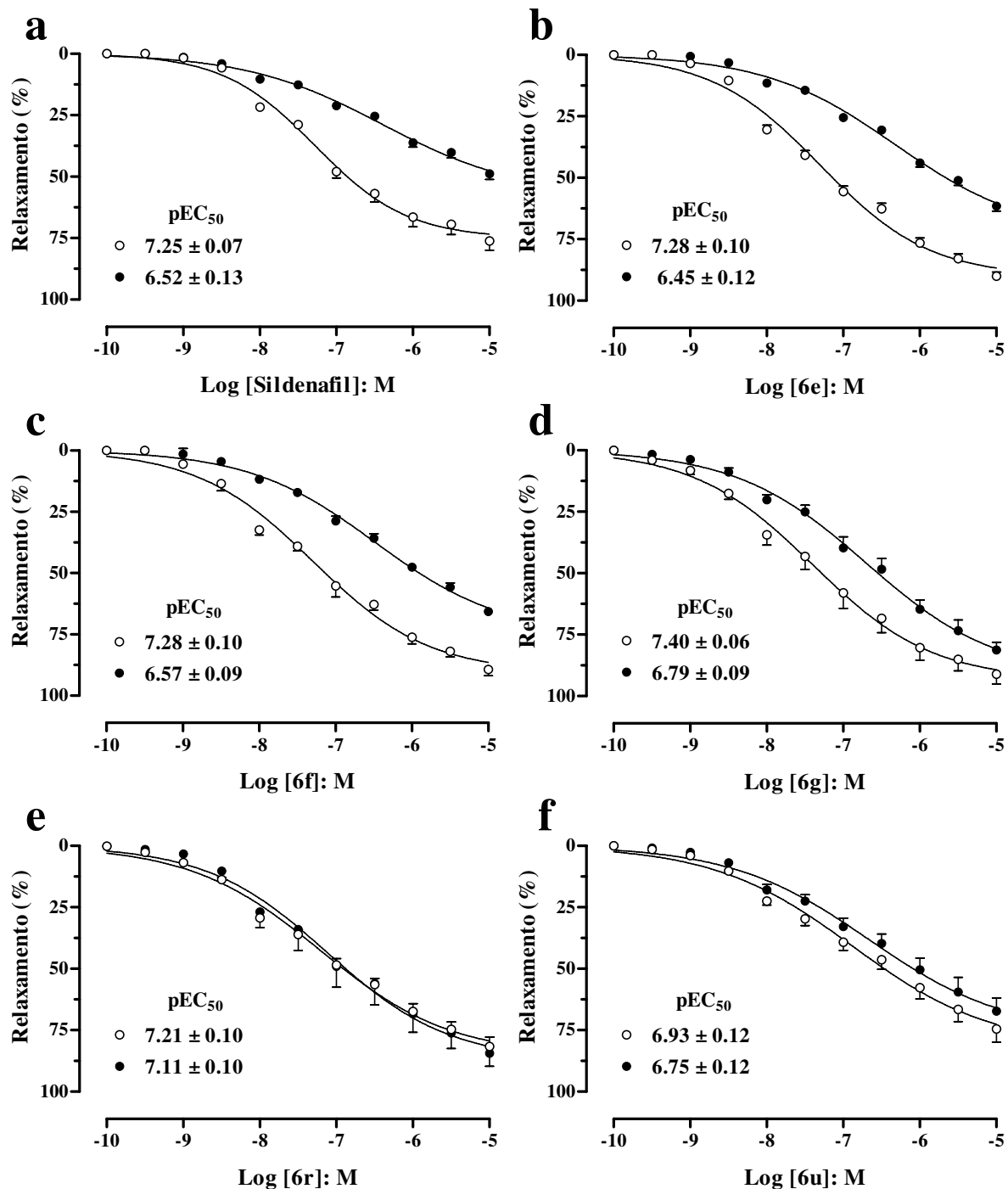


Figura 11. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos do sildenafil (0,0001-10 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (○) ou na presença (●) de L-NAME (100 μM). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.4.1.2. Anéis com endotélio removido

Em anéis cujo endotélio foi previamente removido, a adição de L-NAME (100 μ M) não provocou redução adicional da potência e da resposta máxima.

A figura 12a, 12b, 12c, 12d, 12e e 12f mostra o efeito relaxante do sildenafil e análogos na ausência e na presença do L-NAME na aorta de coelho. Os valores de potência e de resposta máxima estão apresentados no Apêndice F. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice G.

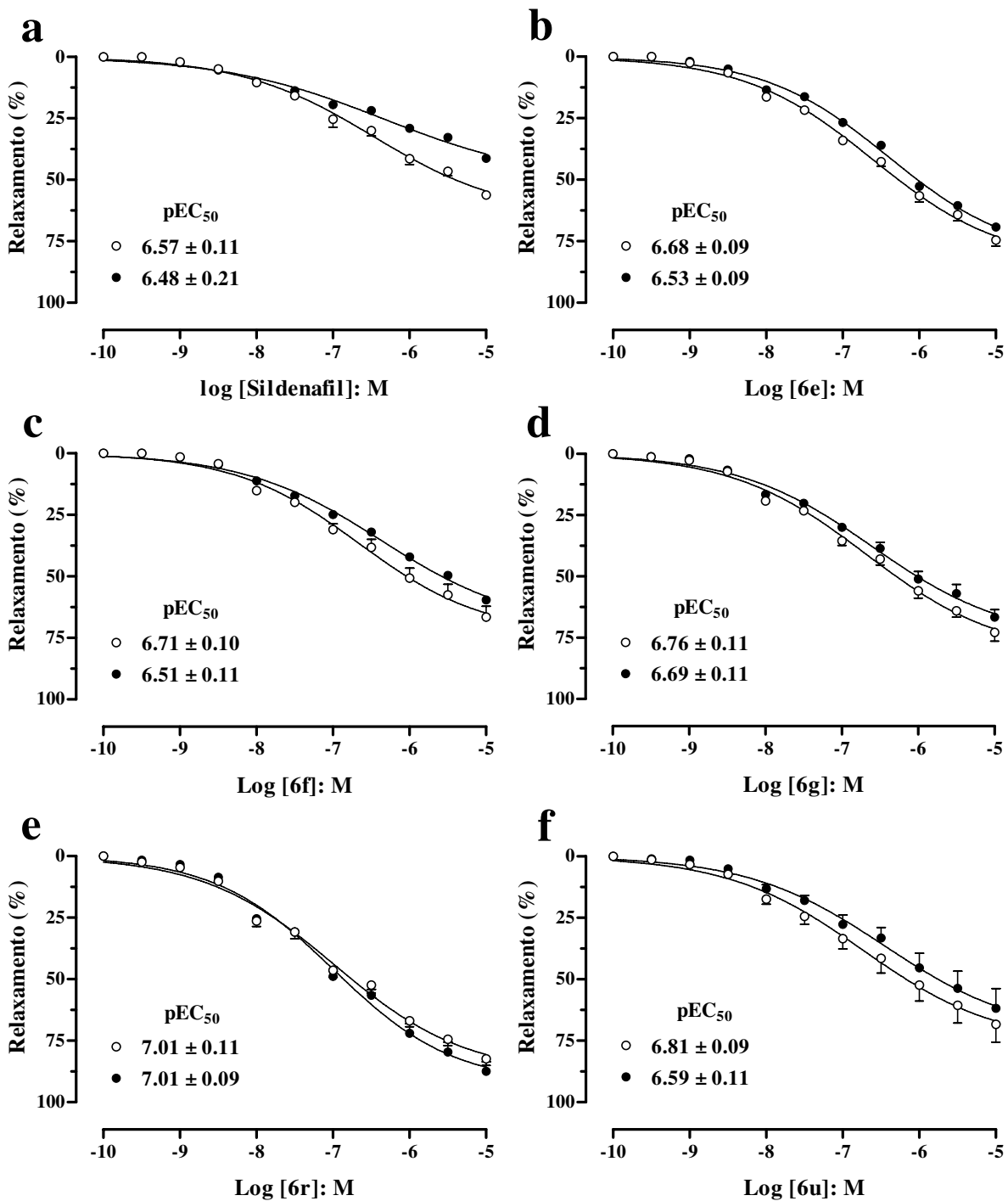


Figura 12. Curvas concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001–10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (○) ou na presença (●) de L-NAME (100 μ M). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.4.2. Efeito do ODQ no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos

3.4.2.1. Anéis com endotélio íntegro

As curvas ao sildenafil e seus análogos foram construídas em anéis de aorta com endotélio íntegro, na presença do ODQ (10 μ M). Comparados com os respectivos controles, o ODQ promoveu redução significativa da resposta máxima do sildenafil (de $76 \pm 8\%$ para $59 \pm 3\%$; Figura 13a), e de seus análogos **6d** ($86 \pm 1\%$ para $69 \pm 4\%$), **6e** ($90 \pm 4\%$ para $63 \pm 5\%$), **6f** ($89 \pm 3\%$ para $64 \pm 3\%$), **6l** ($77 \pm 3\%$ para $57 \pm 2\%$), **6m** ($66 \pm 2\%$ para $50 \pm 3\%$), **6o** ($91 \pm 5\%$ para $64 \pm 5\%$), e **6p** ($93 \pm 2\%$ para $68 \pm 2\%$). O ODQ não alterou significativamente a resposta máxima dos análogos **6a** ($59 \pm 3\%$ para $47 \pm 3\%$), **6b** ($69 \pm 9\%$ para $52 \pm 4\%$), **6c** ($63 \pm 8\%$ para $49 \pm 4\%$), **6i** ($74 \pm 6\%$ para $55 \pm 7\%$), **6n** ($72 \pm 4\%$ para $64 \pm 3\%$), **6s** ($70 \pm 5\%$ para $64 \pm 3\%$), **6t** ($73 \pm 3\%$ para $67 \pm 3\%$), **6v** ($75 \pm 5\%$ para $69 \pm 5\%$), **6r** ($83 \pm 5\%$ para $84 \pm 4\%$), **6g** ($91 \pm 4\%$ para $80 \pm 8\%$), **6h** ($66 \pm 6\%$ para $63 \pm 5\%$), **6q** ($87 \pm 3\%$ para $74 \pm 5\%$), e **6u** ($69 \pm 8\%$ para $55 \pm 3\%$). Além disso, na presença do ODQ, a potência do sildenafil e dos análogos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6s**, **6t** e **6v** foi significativamente reduzida comparada aos respectivos controles, na ausência do ODQ.

Em contrapartida, o relaxamento induzido pelo análogo **6r** e **6u** não foi reduzido nem na potência nem na resposta máxima pelo ODQ (pEC_{50} : $7,21 \pm 0,10$ e $6,93 \pm 0,12$, na ausência; $7,08 \pm 0,09$ e $6,72 \pm 0,11$, na presença do ODQ, respectivamente para **6r** e **6u**; Figura 13e e 13f).

A figura 13b, 13c e 13d mostra o efeito relaxante dos análogos do sildenafil na ausência e na presença do ODQ na aorta de coelho. Os valores de potência, e de resposta máxima

estão apresentados no Apêndice H. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice I.

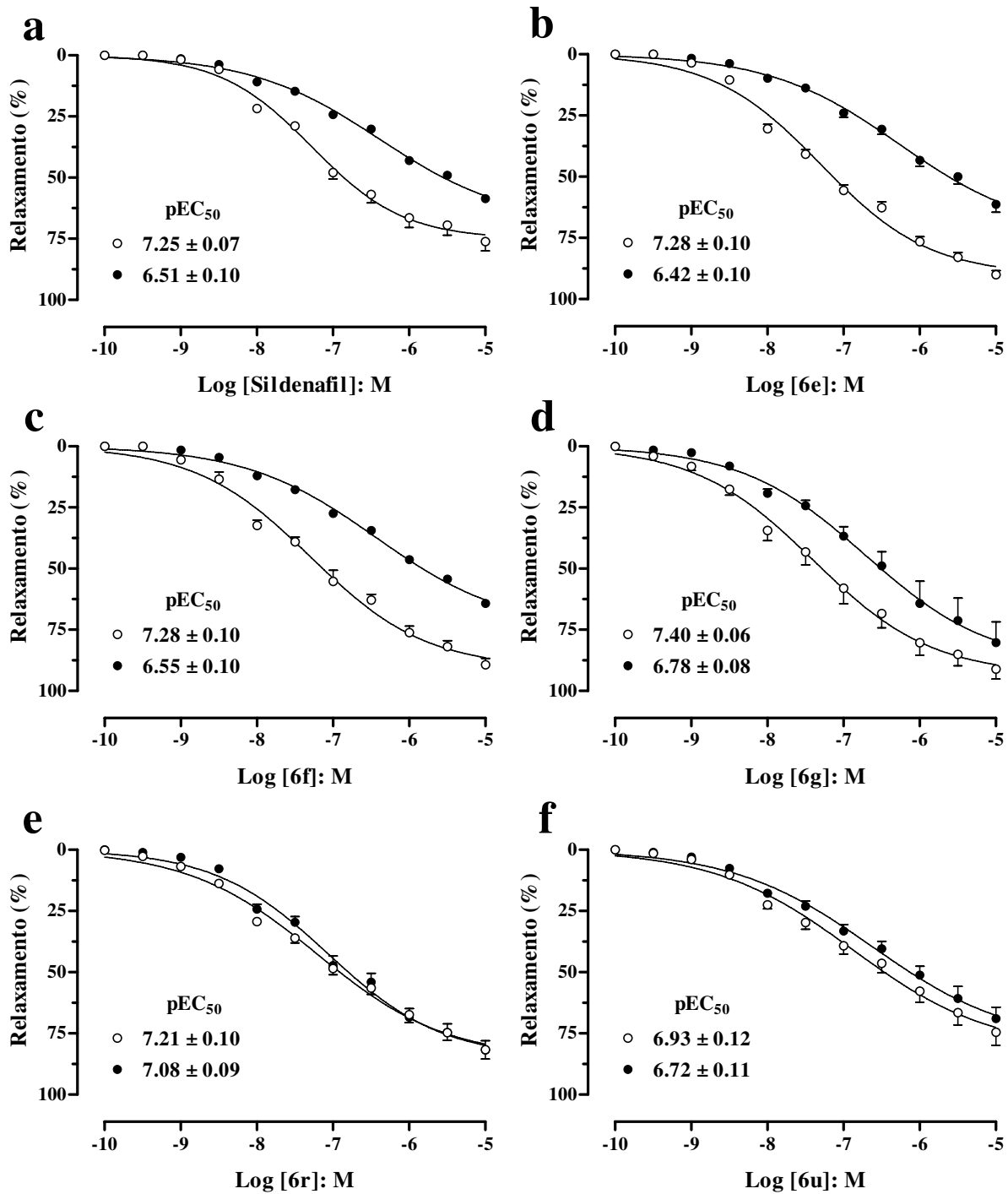


Figura 13. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001–10 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (o) ou na presença (●) de ODQ (10 μM). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.4.2.2. Anéis com endotélio removido

Em anéis cujo endotélio foi previamente removido, a adição de ODQ (10 μ M) não provocou redução adicional da potência e da resposta máxima.

A figura 14a, 14b, 14c, 14d, 14e e 14f mostra o efeito relaxante do sildenafil e análogos na ausência e na presença do ODQ na aorta de coelho. Os valores de potência, e de resposta máxima estão apresentados no Apêndice J. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice K.

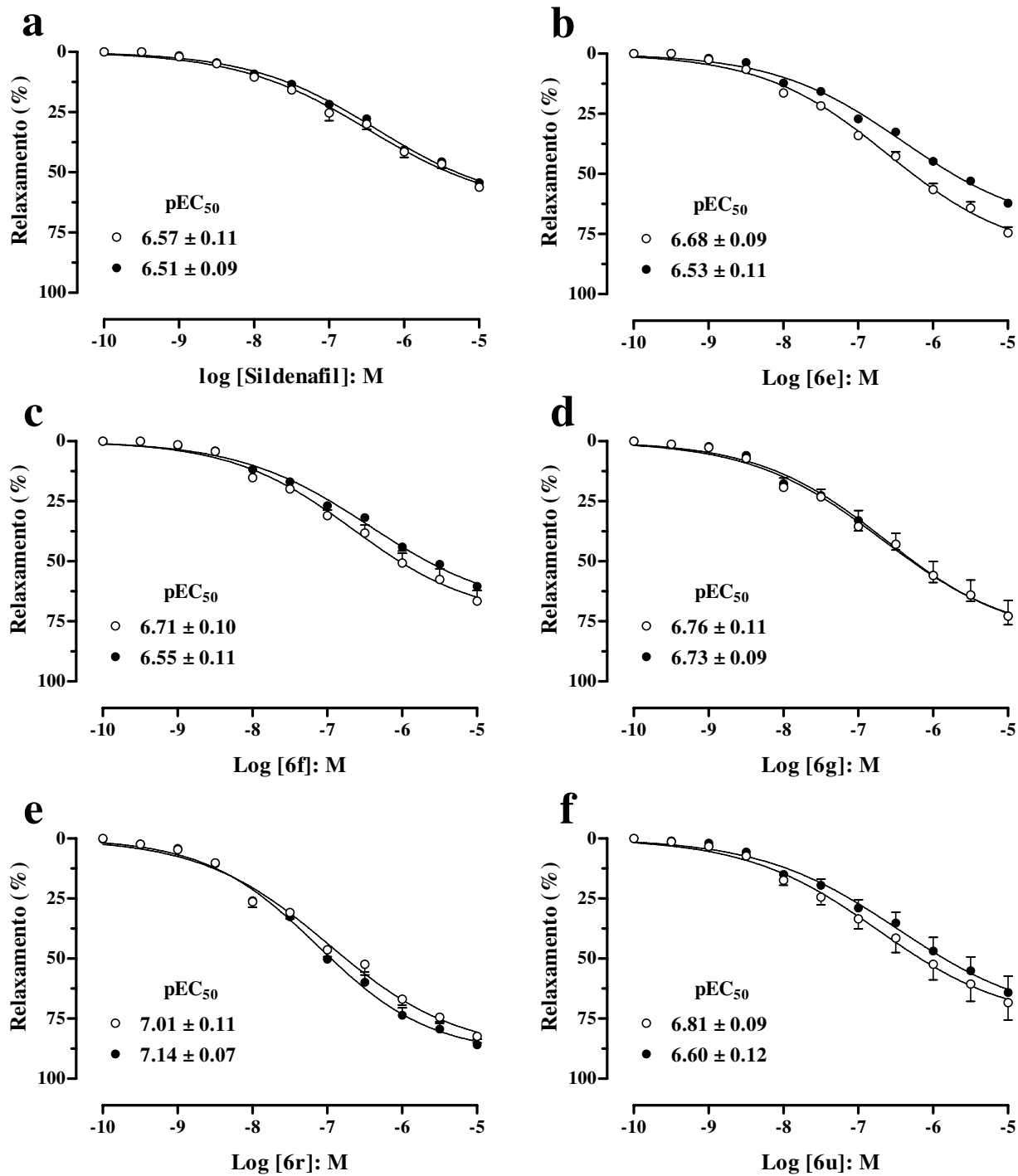


Figura 14. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0.0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (○) ou na presença (●) de ODQ (10 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.4.3. Efeito do BAY 41-2272 no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos

3.4.3.1. Anéis com endotélio íntegro

As curvas ao sildenafil e seus análogos foram construídas em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença do BAY 41-2272 (0,03 μ M). O BAY 41-2272 não alterou nem a resposta máxima nem a potência do sildenafil (Figura 15a) e análogos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6s**, **6t** e **6v**, comparados aos respectivos controles. Entretanto, na presença do BAY 41-2272, houve aumento significativo da potência para o **6f**, **6q**, **6r** e **6u**, quando comparado com seus respectivos controles. Na presença do BAY 41-2272, a potência do **6q**, **6r** e **6u** não foi significativamente maior que a potência do sildenafil, porém a potência do **6f** foi significativamente maior que a potência do sildenafil (Apêndice L).

A figura 15a, 15b, 15c, 15d, 15e e 15f mostra o efeito relaxante do sildenafil e análogos na ausência e na presença do BAY 41-2272 na aorta de coelho. Os valores de potência e de resposta máxima estão apresentados no Apêndice L. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice M.

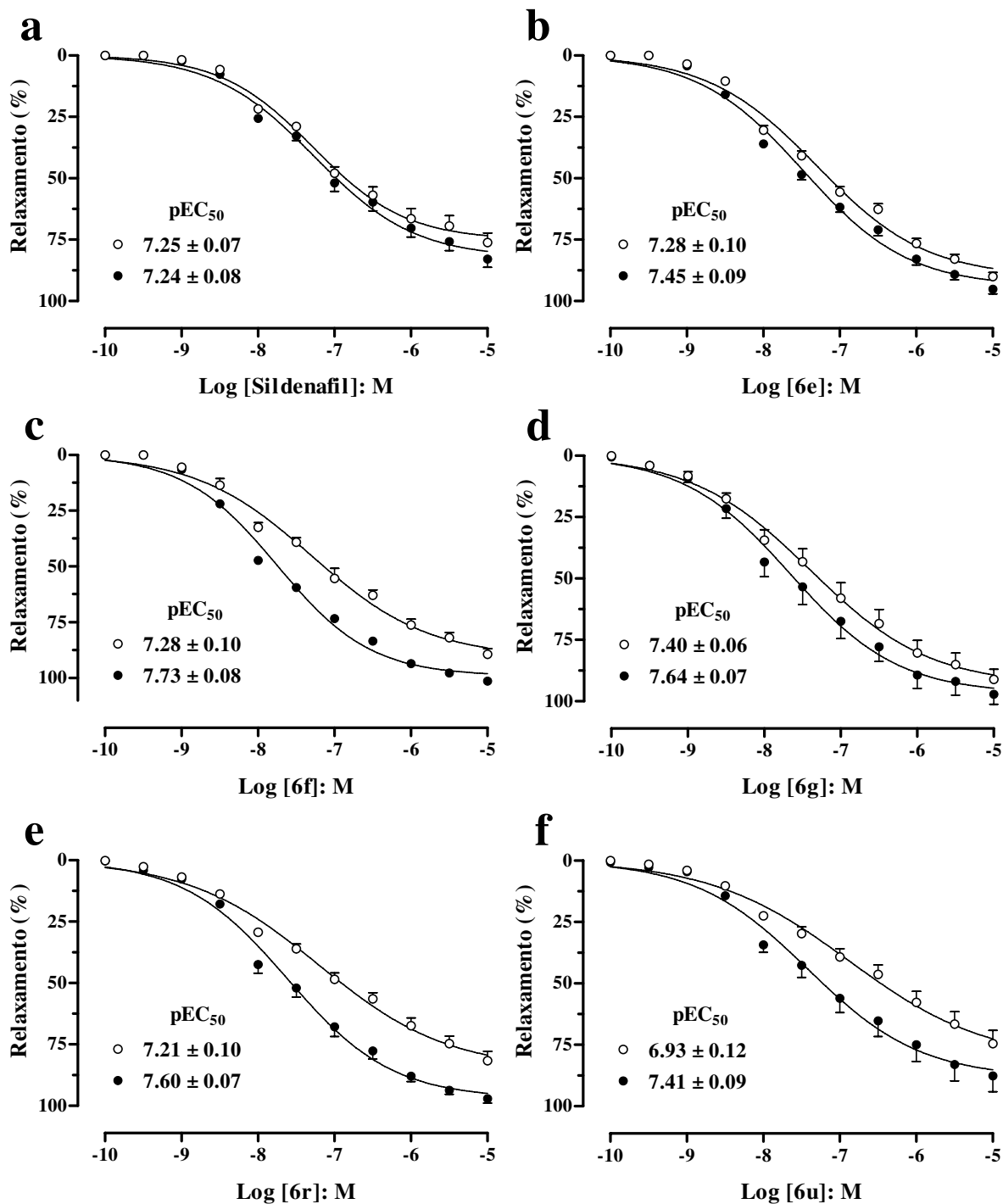


Figura 15. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001–10 μ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (○) ou na presença (●) de BAY 41-2272 (0,03 μ M). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

3.4.4.2. Anéis com endotélio removido

As curvas ao sildenafil e seus análogos foram também construídas em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência e na presença do BAY 41-2272 (0,03 μ M). Na presença do BAY 41-2272, houve aumento significativo da resposta máxima do **6e**, **6f**, **6g**, **6i**, **6q**, **6r**, **6n**, **6o** e **6u** comparados com seus respectivos controles. A resposta máxima do sildenafil e dos análogos, **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6l**, **6h**, **6m**, **6p**, **6s**, **6t** e **6v** não foi alterada na presença do BAY 41-2272. Não houve alteração da potência para o sildenafil, **6a**, **6b**, **6c**, **6l**, **6m**, **6h**, **6s**, **6t** e **6v** na presença do BAY 41-2272. Em contrapartida, os relaxamentos causados pelo **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6i**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6r** e **6u** foram potencializados na presença do BAY 41-2272 (Apêndice N). A potência do **6e**, **6f**, **6g**, **6r** e **6u** foi significativamente maior que a potência do sildenafil.

A figura 16a, 16b, 16c, 16d, 16e e 16f mostra o efeito relaxante do sildenafil e análogos na ausência e na presença do BAY 41-2272 na aorta de coelho. Os valores de potência e de resposta máxima estão apresentados no Apêndice N. As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice O.

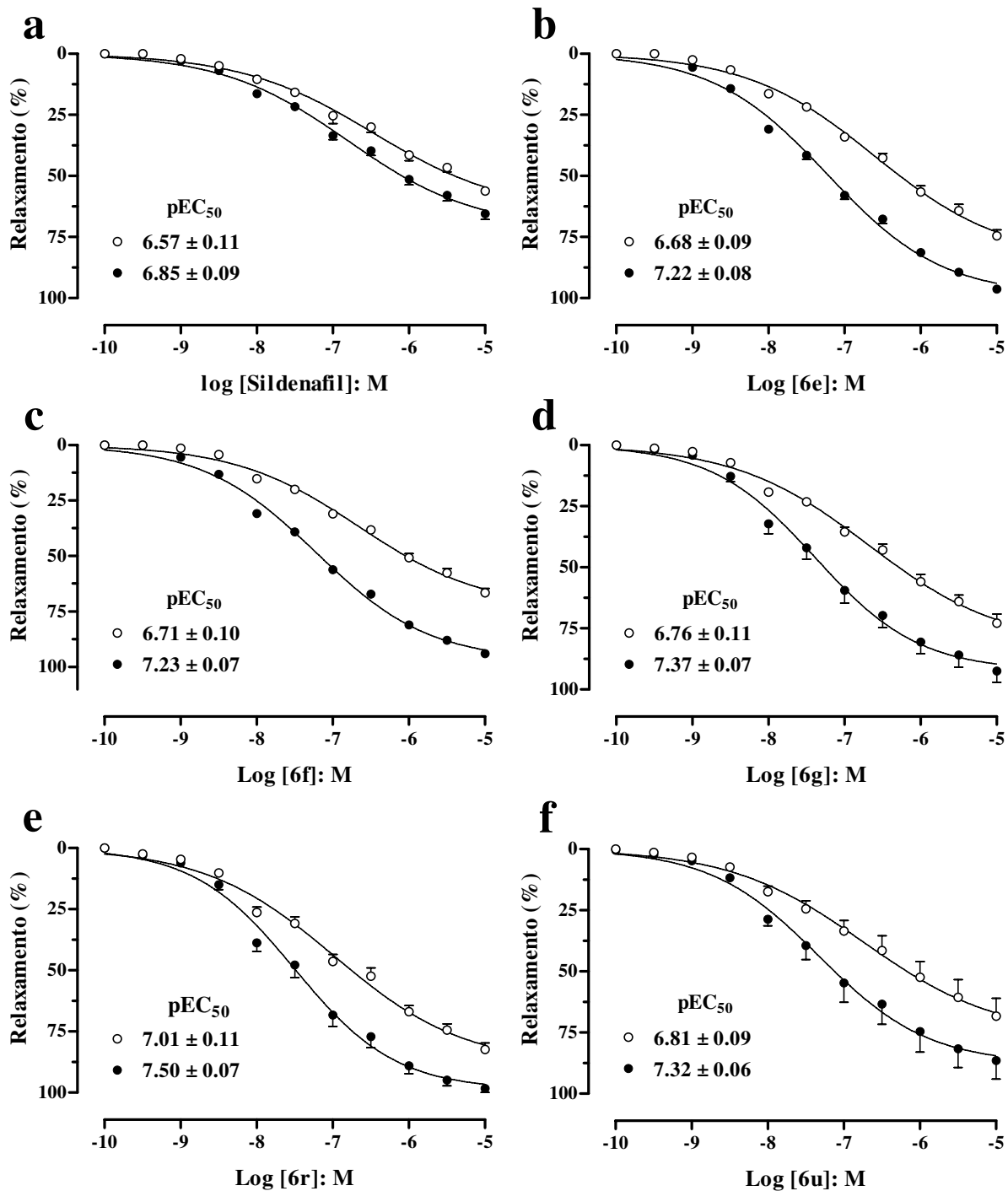


Figura 16. Curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos (0,0001–10 μM) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (o) ou na presença (●) de BAY 41-2272 (0,03 μM). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.5. Mecanismos de Relaxamento Independentes de NO Induzido pelo Sildenafil e Análogos **6r e **6u** na Aorta de Coelho**

3.5.1. Efeito do sildenafil e dos Análogos **6r e **6u** na Contração Induzida pelo CaCl₂**

Curvas concentração-efeito ao CaCl₂ (0,01-10 mM) foram construídas em meio desprovido de cálcio (como descrito nos Métodos), em anéis de aorta com endotélio removido, na presença de diferentes concentrações do sildenafil, **6r** e **6u** (0,1 e 1 μM).

A nifedipina (1 μM; n=6), bloqueador dos canais de Ca²⁺ voltagem dependente tipo L, foi utilizada como controle, e provocou o deslocamento à direita nas curvas ao CaCl₂ e redução da resposta máxima (42 ± 7%; P<0,01).

O sildenafil não alterou nem a potência nem a resposta máxima do CaCl₂ (121 ± 4% e 116 ± 3%, respectivamente para 0,1 e 1 μM; Figura 17) comparado com seu respectivo controle. Similarmente, na presença dos análogos **6r** e **6u**, não houve alteração da potência nem da resposta máxima na contração evocada pelo CaCl₂ (125 ± 17%, 122 ± 15%, 113 ± 4% e 119 ± 10% respectivamente, para **6r** e **6u** nas concentrações de 0,1 e 1 μM) comparado com o respectivo controle.

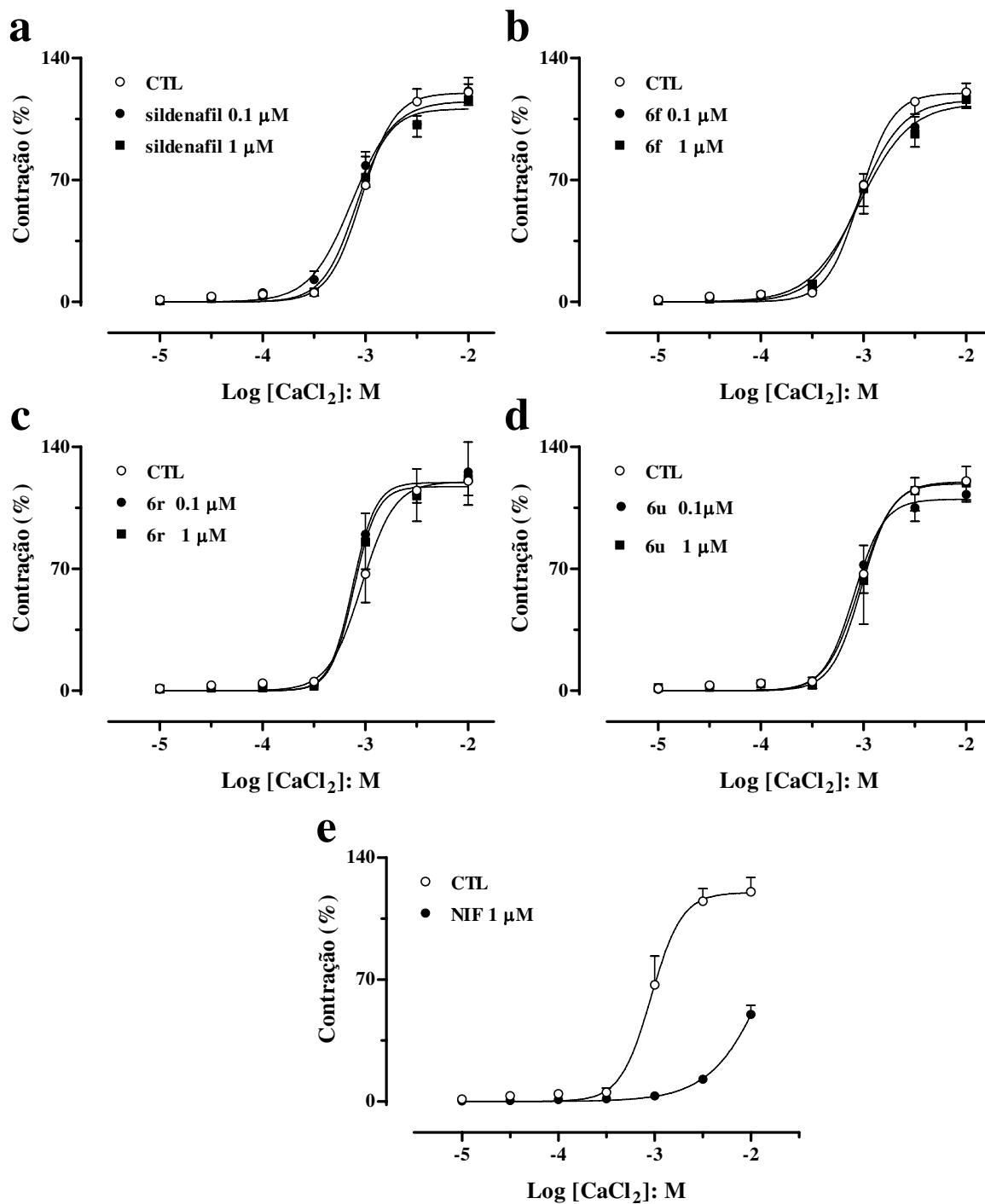


Figura 17. Curvas concentração-efeito ao CaCl_2 (0,01-10 mM) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (CTL; ○) e na presença de 0,1 μM (●) ou de 1 μM (■) de sildenafil (painel a), 6f (painel b), 6r (painel c), 6u (painel d) e nifedipina (painel e). Os valores foram calculados como porcentagem da contração máxima evocada pelo KCl (80 mM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias ± E.P.M. para 4-6 experimentos.

3.5.2. Efeito dos Bloqueadores de Canal de Potássio no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil e Análogos

Curvas concentração-efeito ao sildenafil, **6r** e **6u** foram construídas em anéis de aorta com endotélio removido na ausência ou na presença dos bloqueadores de canais de potássio. Os tecidos foram incubados durante 20 minutos com uma mistura de apamina (1 μM), glibenclamida (10 μM), charibdotoxina (0,1 μM) e tetraetilamonio (3 μM) antes de se contrair os tecidos com fenilefrina (1 μM). Não houve alteração da potência nem da resposta máxima para o sildenafil, **6r** e **6u** na presença dos bloqueadores de canais de potássio (Figura 18).

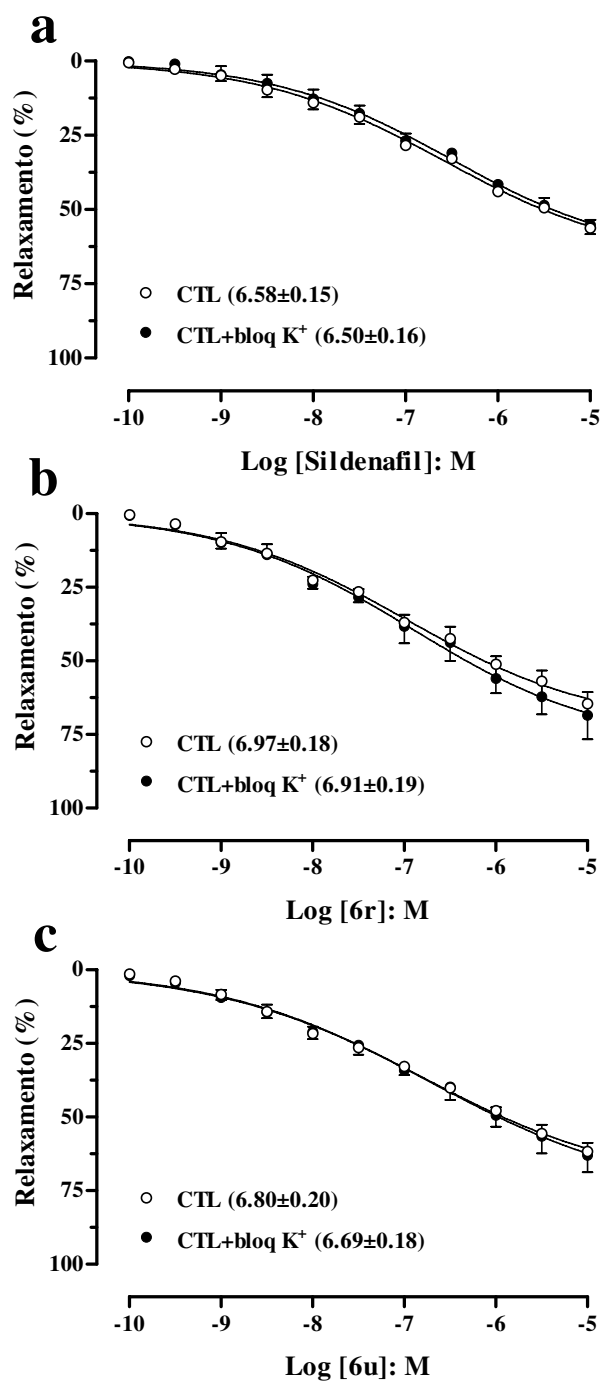


Figura 18. Curvas concentração-efeito (0.0001-10 μ M) ao sildenafil (painel **a**), **6r** (painel **b**), e **6u** (painel **c**) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (○) ou na presença dos bloqueadores de canais de potássio (●). Os valores representam médias \pm E.P.M para 5 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

3.5.3 Efeito da Indometacina no Relaxamento Induzido pelo Sildenafil, **6r** e **6u**

Curvas concentração-efeito aos análogos **6r**, **6u** e sildenafil foram construídas em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência ou na presença do inibidor da ciclooxigenase, a indometacina (10 μ M). A indometacina não alterou nem a resposta máxima nem a potência do sildenafil, do **6r** e do **6u**, comparados com seus respectivos controles (Figura 19a, 19b e 19c).

Usando como controle, curvas concentração-efeito (0,001-10 μ M) para a acetilcolina (ACh) foram construídas em anéis de aorta com endotélio íntegro na presença da indometacina. A ACh promoveu um relaxamento concentração-dependente, cuja resposta máxima foi de $71 \pm 2\%$. Nem a potência nem a resposta máxima da acetilcolina foi alterada na presença da indometacina (Figura 19d).

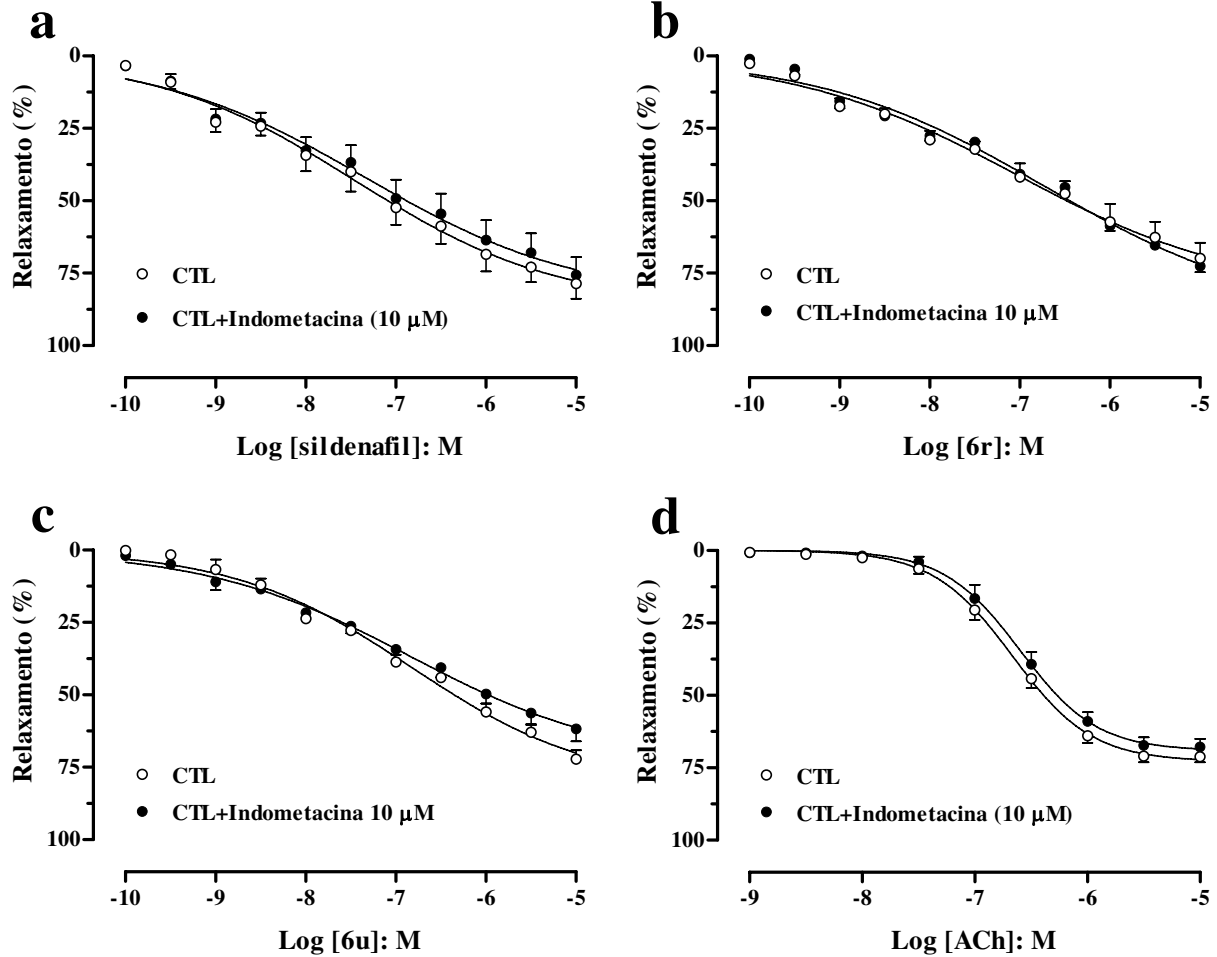


Figura 19. Curvas concentração-efeito (0,0001-10 μ M) ao sildenafil (painel **a**), **6r** (painel **b**), **6u** (painel **c**) e acetilcolina (ACh; 0,001-10 μ M; painel **d**) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (o) ou na presença (●) da indometacina (10 μ M). Os dados representam as médias \pm E.P.M para 4-5 experimentos.

3.6. Efeito do Sildenafil e Análogos do Sildenafil no Relaxamento Induzido pelo Gliceriltrinitrato

Curvas concentração-efeito ao gliceriltrinitrato (GTN) foram construídas em anéis de aorta com endotélio removido e repetidas na presença do sildenafil e dos demais análogos (0,1 μM).

A resposta máxima do GTN não foi alterada na presença do sildenafil ou dos análogos do sildenafil (**6a-v**). Entretanto, a potência do GTN aumentou significativamente na presença do sildenafil e análogos (Tabela 4; Figura 20). As figuras para os outros análogos estão mostradas nos gráficos do Apêndice P.

Tabela 4. Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) do gliceriltrinitrato (GTN) em anéis de aorta com endotélio removido, na presença ou na ausência dos análogos do sildenafil. O *shift* representa o deslocamento à esquerda provocado pelo GTN.

	pEC ₅₀		<i>Shift</i> [†]	E _{max} (%)	
	Ausência	Presença		Ausência	Presença
Sildenafil	7,26 ± 0,01	7,78 ± 0,01**	3	95 ± 2	96 ± 2
6a	7,26 ± 0,03	7,66 ± 0,07*	3	100 ± 5	95 ± 3
6b	7,25 ± 0,06	7,63 ± 0,01*	2	96 ± 7	94 ± 5
6c	7,04 ± 0,04	7,45 ± 0,04*	3	95 ± 5	93 ± 5
6d	7,32 ± 0,01	7,75 ± 0,02*	3	90 ± 6	91 ± 7
6e	7,12 ± 0,01	7,61 ± 0,01*	3	93 ± 2	94 ± 1
6f	7,33 ± 0,01	7,90 ± 0,01**	4	99 ± 3	101 ± 2
6g	7,38 ± 0,01	7,87 ± 0,01**	3	96 ± 2	98 ± 1
6h	7,29 ± 0,01	7,84 ± 0,02**	4	89 ± 5	96 ± 2
6i	7,32 ± 0,01	7,64 ± 0,01*	3	99 ± 3	93 ± 2
6l	7,17 ± 0,04	7,51 ± 0,05*	2	95 ± 1	95 ± 1
6m	7,22 ± 0,04	7,61 ± 0,02	2	89 ± 5	83 ± 3
6n	7,29 ± 0,01	7,74 ± 0,01*	2	96 ± 2	95 ± 2
6o	7,26 ± 0,01	7,73 ± 0,01**	3	95 ± 2	95 ± 2
6p	7,29 ± 0,02	7,79 ± 0,01**	3	89 ± 3	97 ± 1
6q	7,41 ± 0,01	7,94 ± 0,01**	3	94 ± 3	99 ± 1
6r	7,29 ± 0,01	7,93 ± 0,01**	4	97 ± 1	99 ± 2
6s	7,32 ± 0,01	7,82 ± 0,01**	3	91 ± 6	98 ± 2
6t	7,42 ± 0,01	7,75 ± 0,01*	2	97 ± 2	96 ± 2
6u	7,27 ± 0,01	7,84 ± 0,01**	4	91 ± 5	95 ± 5
6v	7,36 ± 0,01	7,98 ± 0,02**	4	93 ± 3	100 ± 3

[†]*shift* provocado pelo GTN. Dados representam as médias ± E.P.M. para 5 experimentos.
*P<0,05; **P<0,01, comparado com seu valor controle.

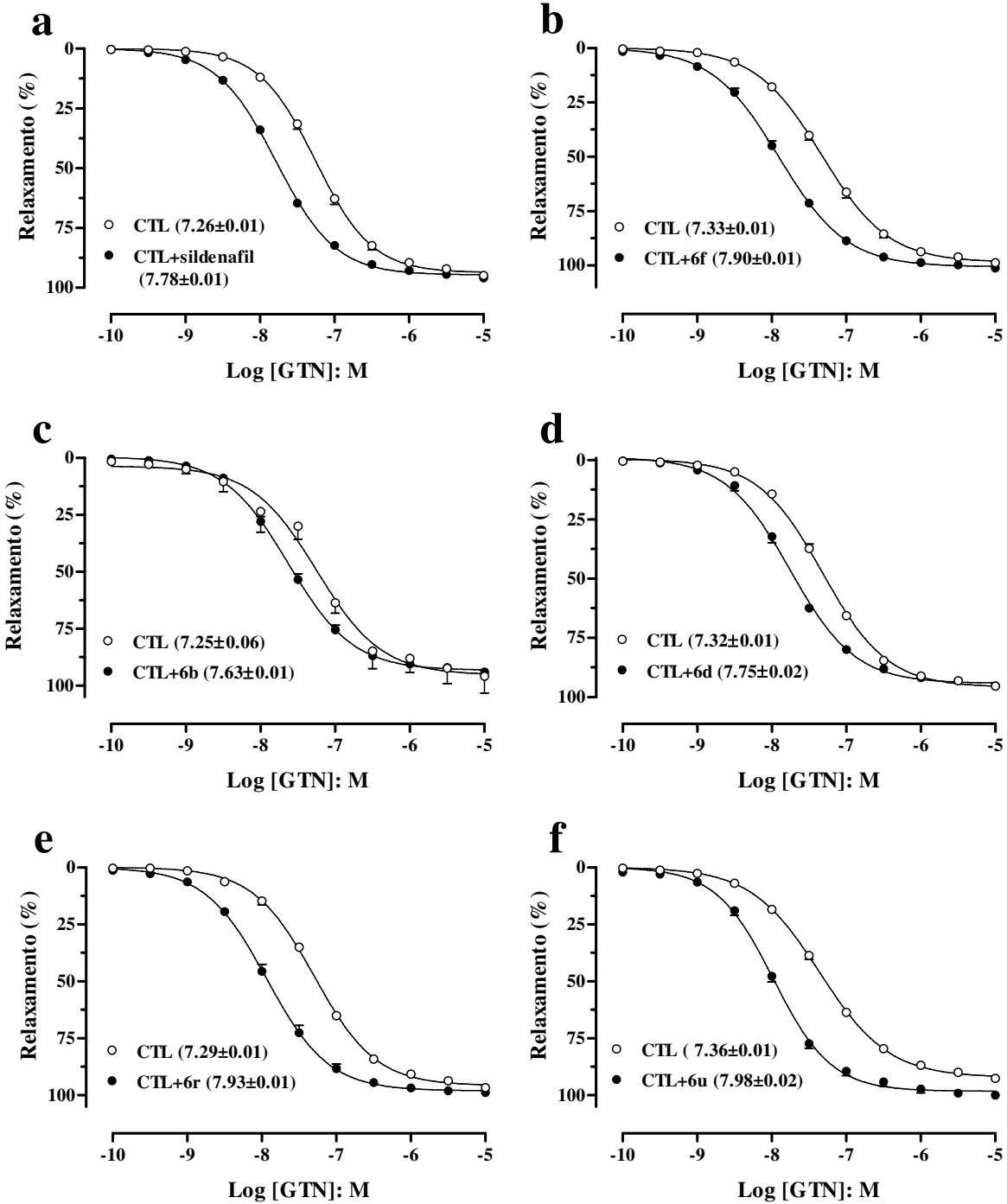


Figura 20. Curva concentração-efeito ao gliceriltrinitrato (GTN; 0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (○) ou na presença (●) do sildenafil e análogos (0,1 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 5 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos em cada painel.

4. DISCUSSÃO

O nucleotídeo cíclico GMPc representa um dos mecanismos endógenos mais efetivos na inibição das funções plaquetárias e da regulação do tônus vascular. Os níveis deste nucleotídeo cíclico são regulados pela ativação da guanilil ciclase solúvel e pela degradação pela PDE5. O principal alvo deste nucleotídeo cíclico é a PKG, que medeia seus efeitos através da fosforilação de proteínas.

Em plaquetas e músculo liso há elevada concentração de PDE5, e, por isso, ensaios funcionais e bioquímicos em plaquetas e músculo liso têm sido bastante usados para o desenvolvimento de novos compostos visando seletividade na degradação do GMPc. No presente estudo, investigamos o efeito de vinte análogos do sildenafil na atividade da PDE5 em plaquetas humanas e no relaxamento da musculatura lisa de corpo cavernoso e de aorta de coelho *in vitro*. Considerando que o grupo pirazolopirimidinona do sildenafil é o responsável pela atividade inibitória da PDE5, desenho-se e sintetizou-se vinte moléculas análogas do sildenafil onde o anel e o grupo metil da piperazina foram substituídos por moléculas de cadeia alifática ou cíclica. Este potencial inibitório do grupo pirazolopirimidina se baseia na similaridade estrutural à base da purina do GMPc na ligação com a PDE5 (Grofrani e Grimminger, 2006). Este foi o passo pioneiro para a síntese do sildenafil, que vem sendo cada vez mais modificado estruturalmente, visando prolongar seus efeitos no tratamento da disfunção erétil e diminuir seus efeitos colaterais, tornando uma droga mais seletiva para a PDE5 (Kim *et al.*, 2001a; 2001b; Allerton *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostram que a ligação de outros substituintes de cadeia alifática ou cíclica no grupo metil da piperazina e que a substituição do grupo piperazina pela n'n'etilendiamina não prejudicam a inibição da PDE5, provavelmente pelo fato de o grupo

pirazolopirimidinona do sildenafil ser o responsável pela ligação na PDE5. Um estudo prévio mostrou que as modificações da estrutura molecular do sildenafil nos grupos sulfonamida ou piperazina conservam a atividade inibitória na PDE5 dos novos compostos (Kim *et al.*, 2001c).

A inibição da atividade da PDE5 de plaquetas humanas pelos análogos do sildenafil foi concentração-dependente. Os análogos **6c**, **6e**, **6f**, **6h**, **6i**, **6l** e **6o** apresentaram bom potencial inibitório para a PDE5, mas não vimos diferenças significativas quando comparados ao sildenafil. Por outro lado, os análogos **6m**, **6n** e **6q** apresentaram valores elevados de IC₅₀ para inibir a atividade da PDE5, enquanto os análogos **6a**, **6b**, **6d**, **6g** e **6p** não produziram nem 50% da atividade inibitória da PDE5 em plaquetas humanas. Os análogos derivados da molécula n'n'etilenodiamina (**6r**, **6s**, **6t**, e **6v**) mostraram boa atividade inibitória de PDE5 com valores de IC₅₀ entre 0.20-0.51 µM. Interessantemente o análogo **6u** mostrou o melhor valor inibitório de PDE5. Nossos resultados sugerem que a molécula piperazina não é fundamental para inibir a atividade da PDE5 em plaquetas humanas.

O efeito dos análogos do sildenafil foi também avaliado em corpo cavernoso de coelho pré-contraídos com fenilefrina. Nossos resultados mostraram que o sildenafil bem como seus análogos foram capazes de produzir relaxamento de maneira concentração-dependente, exceto o composto **6m**, que se mostrou desprovido de atividade relaxante.

Estudos recentes em musculatura lisa vascular como aorta de rato (Teixeira *et al.*, 2006; Mochida *et al.*, 2002) e corpo cavernoso de coelho (Giuliano *et al.*, 2003) mostraram que o relaxamento produzido pelos inibidores da PDE5 é modulado pelo NO endógeno. Nossos resultados corroboram com estes dados, uma vez que o relaxamento promovido pelo

sildenafil foi deslocado à direita na presença do inibidor do NO sintase, L-NAME. Estes resultados indicam claramente que o sildenafil é capaz de liberar NO do tecido erétil, amplificando sua resposta relaxante. Resultados similares foram obtidos para os análogos **6a**, **6c**, **6e**, **6f**, **6n**, **6o** e **6p** quando comparados ao sildenafil em valores de potência. De um modo geral, nossos resultados mostram que diferentes substituições no grupo metil do anel piperazina resultam em grande variedade de compostos com propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas, as quais permitem a ligação no sítio catalítico da PDE5. Da mesma forma, diversos análogos apresentaram uma excelente combinação, tanto na inibição enzimática como no relaxamento do corpo cavernoso. Em resumo, nossos resultados mostram que, à exceção do análogo **6m**, os análogos do sildenafil são capazes de produzir relaxamento concentração-dependente em preparações de corpo cavernoso de coelho. Em particular, o composto **6f** mostrou o melhor perfil relaxante, podendo servir de base para o desenvolvimento de novos inibidores de PDE5.

O efeito relaxante do sildenafil e seus análogos do sildenafil foram também investigados em anéis de aorta isolada de coelho. Em preparações com endotélio íntegro ou removido, os análogos testados (**6a-v**) produziram relaxamento concentração-dependente com potência similar à do sildenafil, à exceção dos análogos **6b** e **6m**, que apresentaram menor potência quando comparada à do sildenafil em anéis com endotélio íntegro.

Para investigar a participação do endotélio e da via NO/GMPc no relaxamento induzido pelos análogos de sildenafil, curvas concentração-efeito foram construídas em anéis de aorta com endotélio intacto (ou removidos) e/ou na presença do L-NAME (inibidor da síntese de NOS), ODQ (inibidor da guanilil ciclase solúvel) ou BAY 41-2272 (ativador da guanilil ciclase solúvel independente de NO). Diferentemente do sildenafil, a remoção do

endotélio não afetou o relaxamento máximo induzido pelos análogos **6n**, **6q**, **6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**. Além disso, a potência do **6r** e do **6u** não foi reduzida em anéis desprovidos de endotélio, nem se mostrou diferente da potência do sildenafil. Resultados similares foram obtidos quando as curvas concentração-efeito para os análogos foram realizadas em anéis com endotélio íntegro, porém na presença de L-NAME ou de ODQ. A adição de L-NAME ou de ODQ em tecidos desprovidos de endotélio não provocou efeito adicional na redução da potência. Outra importante observação é a de que a magnitude do deslocamento à direita na curva concentração-efeito ao sildenafil e análogos **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6h**, **6i**, **6l**, **6m**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6s**, **6t** e **6v** provocado tanto pelo L-NAME quanto pelo ODQ é similar àquela obtida em preparações desprovidas de endotélio. Estes resultados indicam claramente que o NO endotelial modula o relaxamento evocado pelos inibidores de PDE5.

Sabe-se que a GCs do músculo liso vascular produz níveis elevados de GMPc, mesmo na ausência de NO basal (Lucas *et al.*, 2000). Desta forma, a inibição da PDE5 pelo sildenafil aumenta os níveis de GMPc, levando à vasodilatação por impedir a degradação do GMPc, mesmo na ausência de NO derivado do endotélio. Estudo recente em aorta de rato mostrou que o relaxamento evocado pelos inibidores de PDE5, sildenafil, tadalafil e vardenafil, envolve a participação da via de sinalização NO/GMPc. Além disso, o vardenafil causa inibição do influxo extracelular de Ca^{2+} e/ou inibe a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Teixeira *et al.*, 2006). Nossos resultados corroboram com os achados de que o relaxamento do músculo liso induzido pelos inibidores de PDE5 é modulado pela ativação da via de sinalização NO/GMPc. Isto inclui musculatura lisa vascular, como aorta de rato (Teixeira *et al.*, 2006; Mochida *et al.*, 2002), artéria basilar de coelho (Salom *et al.*, 2006), corpo cavernoso de coelho (Giuliano *et al.*, 2003; Lau e

Adaikan, 2006), artéria coronária de cobaia (Sakuma *et al.*, 2002) e artérias intrapulmonares de rato (Andersen *et al.*, 2005).

Por outro lado, como mencionado anteriormente, nem a potência nem a resposta máxima dos análogos **6r** e **6u** foi modificada pela remoção do endotélio ou pelo uso do L-NAME e ODQ, sugerindo que estes dois análogos, diferentemente dos demais, relaxam a musculatura lisa por mecanismos independentes do endotélio ou da liberação basal de NO.

Os níveis de GMPc na célula muscular lisa são controlados, principalmente, pelo balanço entre as atividades de síntese pela guanilil ciclase solúvel e de degradação pela PDE5 (Jeremy *et al.*, 1997). O BAY 41-2272, descrito como ativador da guanilil ciclase solúvel, aumenta os níveis de GMPc, provocando relaxamento por mecanismos independentes de NO e sem interferir com a atividade da PDE (Stasch *et al.*, 2001; 2002). Por outro lado, Mullershausen *et al.* (2004) demonstraram que, em doses elevadas, o BAY 41-2272, além de estimular a guanilil ciclase solúvel, também inibe a atividade da PDE5 em plaquetas. Em nosso estudo, observamos que em anéis com endotélio íntegro, o BAY 41-2272 potencializou o efeito relaxante somente dos análogos **6f**, **6q**, **6r** e **6u** sem alterar a resposta máxima. Baracat *et al.* (2003) demonstraram que, em corpo cavernoso humano e de coelho, as atividades relaxantes do sildenafil e do BAY 41-2272 são aditivas e não sinérgicas. No entanto, nossos dados mostraram que, em aorta de coelho, os análogos **6f**, **6q**, **6r** e **6u** são mais potentes na presença do BAY 41-2272, sugerindo uma melhor atividade inibitória da PDE5, possivelmente por aumentar os níveis de GMPc. Em anéis desprovidos de endotélio, o BAY 41-2272 potencializou os efeitos relaxantes dos análogos **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **6i**, **6n**, **6o**, **6p**, **6q**, **6r** e **6u**, e aumentou significativamente a resposta máxima do **6e**, **6f**, **6g**, **6i**, **6q**, **6r**, **6n**, **6o** e **6u**. É possível que a remoção do endotélio, e,

conseqüentemente, a ausência de NO basal, tenha contribuído para que o BAY 41-2272 apresentasse um efeito aditivo no relaxamento evocado por estes análogos. Em anéis desprovidos de endotélio, na presença do BAY 41-2272, o relaxamento evocado pelo análogo **6e**, **6f**, **6g**, **6r** e **6u** foi significativamente maior que o relaxamento induzido pelo sildenafil. Os mecanismos associados à melhor resposta destes análogos em relação ao sildenafil ainda não nos são claros. No entanto, aliado ao fato que o relaxamento induzido pelo **6r** e **6u** não é afetado pela remoção do endotélio ou pelo bloqueio da via NO/GMPc, estes dados reforçam a idéia de que estes dois análogos podem estar promovendo relaxamento da aorta por mecanismos diferentes daqueles do sildenafil e dos outros análogos. No entanto, mais estudos são necessários para que possamos elucidar as diferenças destes dois análogos comparados aos demais compostos.

A elevação da concentração intracelular de GMPc é determinada pelo tipo e combinação das proteínas-alvo e substratos, enzimas que metabolizam o GMPc expressas nas células, bem como sua organização e localização em compartimentos celulares e organelas. O aumento intracelular dos níveis de GMPc causado pelos nitrovasodilatadores e pelo NO favorece, por exemplo, o relaxamento do músculo liso por dessensibilizar o aparato contrátil ao Ca^{2+} e por reduzir o Ca^{2+} intracelular (Lucas *et al.*, 2000; Murphy e Walker, 1998). Desta forma, os níveis intracelulares de GMPc são modulados pela atividade das enzimas NOS, guanilil ciclase solúvel e PDEs. No presente estudo, o sildenafil e todos os seus análogos potencializaram o relaxamento promovido pelo gliceriltrinitrato, provavelmente pelo acúmulo maior de GMPc, sugerindo uma ação sinérgica entre as duas drogas. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados *in vitro* em diferentes preparações vasculares (Sharabi *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2004;

Sakuma *et al.*, 2002; Sampson *et al.*, 2001), *in vivo* em humanos saudáveis (Dishy *et al.*, 2001), e em tratamentos clínicos nos quais observaram-se interações sinérgicas de nitratos e inibidores de PDE5 (Kloner *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2000). Em resumo, nossos resultados mostram que os análogos do sildenafil são capazes de relaxar anéis de aorta de coelho com endotélio íntegro ou removido de maneira concentração-dependente, e com potência equivalente ao sildenafil, à exceção dos análogos **6b** e **6m** que apresentaram valores de potência inferiores à do sildenafil em tecidos com endotélio íntegro. Somente os análogos **6r** e **6u** não apresentaram diminuição da potência decorrente da inibição do NO, seja pela remoção do endotélio ou pela inibição da NOS ou da inibição da guanilil ciclase solúvel. Nossos dados também mostram que o BAY 41-2272 é capaz de aumentar a potência dos análogos **6r** e **6u**.

Baseado nos resultados acima discutidos, passamos a investigar a hipótese que o efeito relaxante do sildenafil e dos análogos **6r** e **6u** poderia envolver a participação de canais de cálcio e/ou de potássio. Vários autores têm proposto diversos mecanismos para explicar o relaxamento vascular decorrente da ativação da via NO/GMPc. Estes mecanismos incluem a ativação da PKG, a desfosforilação da cadeia leve de miosina, assim como a ativação de canais de cálcio e potássio (Karaki *et al.*, 1997; Horowitz *et al.*, 1996). O tônus da musculatura lisa vascular é regulado pela $[Ca^{2+}]_i$ e a sensibilidade ao Ca^{2+} por elementos contráteis (Karaki *et al.*, 1997), que pode ocorrer pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático ou pelo aumento do influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular através dos canais de Ca^{2+} operados por receptor. O principal mecanismo de entrada de cálcio para o meio intracelular na musculatura lisa vascular se dá através da ativação da subunidade alfa dos canais de Ca^{2+} do tipo L. Desta maneira, o bloqueio destes canais, e,

conseqüentemente, a inibição do influxo de Ca^{2+} provoca um relaxamento de vasos pré-contráídos (Kuriyama *et al.*, 1995). No presente estudo, avaliamos a influência do sildenafil, do **6r** e do **6u** na contração induzida pela adição de CaCl_2 exógeno em anéis de aorta com endotélio removido. Nossos resultados mostraram que nem o sildenafil nem os análogos **6r** e **6u** foram capazes de inibir a contração induzida pelo CaCl_2 extracelular. Estes resultados corroboram com os achados de Teixeira *et al.* (2006) que demonstraram que o sildenafil e o tadalafil não interferem na contração induzida pelo CaCl_2 em aorta de rato. Por outro lado, o vardenafil, além de aumentar os níveis de GMPc através da inibição da PDE5, bloqueia a entrada do Ca^{2+} externo para o interior da célula muscular lisa, facilitando o relaxamento (Teixeira *et al.*, 2006). Nosso grupo, utilizando artéria pulmonar de coelho, demonstrou recentemente que o vardenafil (mas não o sildenafil ou o tadalafil) inibe o influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular, corroborando assim com os resultados obtidos neste estudo (Toque *et al.*, 2008b). Outro trabalho mostrou que o sildenafil tem afinidade pelos canais de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L (Mochida *et al.*, 2002). No entanto, neste estudo, foram utilizadas concentrações elevadas de sildenafil. De qualquer modo, nossos dados indicam que o mecanismo de relaxamento da aorta de coelho evocado pelo sildenafil e análogos **6r** e **6u** não envolve bloqueio do influxo de cálcio.

Investigamos ainda se o relaxamento induzido pelo sildenafil, **6r** e **6u** envolve a participação de canais de potássio. Trabalhos prévios, utilizando artéria peniana de eqüinos, constataram que o NO liberado de fibras NANC age por ativação da GCs e acúmulo de GMPc, seguido de abertura de canais de potássio ativados por Ca^{2+} . Estes canais, quando ativados, causam hiperpolarização da membrana e relaxamento da artéria peniana, auxiliando no mecanismo de ereção (Simonsen *et al.*, 1995). Onoue *et al.* (1997)

demonstraram que o relaxamento induzido pelo zaprinast (inibidor de PDE5) foi significativamente reduzido pela charibdotoxina em artérias cerebrais de cobaia. Outro trabalho mostrou que os canais de potássio estão envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina em aorta de rato, pois, a charibdotoxina e 4-aminopiridina reduzem este efeito relaxante (Ferrer *et al.*, 1999); assim, canais de potássio dependentes de Ca^{2+} de alta condutância parecem mediar, ao menos parcialmente, a resposta relaxante do GMPc. Nossos resultados mostram que em anéis desprovidos de endotélio, o relaxamento induzido pelo sildenafil, **6r** e **6u** não envolve a participação de canais de potássio, uma vez que na presença dos bloqueadores de canais de potássio (charibdotoxina, apamina, glibenclamida e tetraetilamonio) não notamos alteração significativa das respostas relaxantes. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios mostrando que o relaxamento induzido pelo sildenafil na artéria peniana é devido à inibição da quebra do GMPc para GMP, e que canais de potássio sensíveis ao ATP não participam de forma significativa no relaxamento evocado pelo NO e outros agentes que aumentam os níveis de GMPc neste tipo de tecido (Rubio *et al.*, 1995; Simonsen *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 1998).

No geral, nossos resultados mostram que o relaxamento induzido pelo sildenafil (mas não pelos análogos **6r** e **6u**) é modulado pela via NO-GCs-GMPc. Por outro lado, nem canais de potássio nem de cálcio estão envolvidos no relaxamento induzido pelo sildenafil e análogos **6r** e **6u**.

Sabe-se que em alguns leitos vasculares com endotélio íntegro, o relaxamento induzido pela acetilcolina envolve além do NO, a formação de prostaciclina endotelial, que atua ativando a adenilil ciclase promovendo acúmulo de AMPc no músculo liso. Assim, investigamos se o relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil ocorre por produção

de prostaciclina. Observamos que o relaxamento produzido pelos análogos do sildenafil não foi alterado pela indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase), excluindo a possibilidade destes análogos estarem promovendo relaxamento pela produção de prostanóides, ou mesmo por inibir fatores contratéis liberados pelo endotélio, derivados da via da ciclooxigenase.

Em resumo, o relaxamento induzido pelo sildenafil, **6r** e **6u** não envolve a participação de canais de potássio e de cálcio, nem envolve a formação de prostanóides. As respostas relaxantes destes dois análogos não foram alteradas em tecidos desprovidos de endotélio e foram independentes da via NO/GMPc, sugerindo que estes análogos podem ser de particular interesse em diversas patologias onde ocorre disfunção endotelial. Assim, seria de interesse realizar estudos de farmacocinética com os análogos **6r** e **6u** para se explorar suas potencialidades terapêuticas.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- I. A molécula piperazina não é necessária para a atividade inibitória da PDE5 plaquetária visto que o sildenafil e seus análogos (**6c**, **6e**, **6f**, **6h**, **6i**, **6l** e **6o**) conseguiram inibir a atividade da PDE5 plaquetária de maneira concentração-dependente. Os análogos derivados da molécula n'n'etilenodiamina (**6r**, **6s**, **6t**, **6u** e **6v**) apresentaram boa atividade inibitória.
- II. O sildenafil e análogos do sildenafil induziram relaxamento concentração-dependente em corpo cavernoso de coelho, à exceção do análogo **6m**. O análogo **6f** mostrou o melhor perfil farmacológico no relaxamento.
- III. O sildenafil e análogos do sildenafil evocaram relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta de coelho. Tendo em vista que, o relaxamento induzido pelos análogos **6r** e **6u** na aorta de coelho não é alterado em tecidos desprovidos de endotélio, nem dependente da via NO/GMPc.
- IV. O relaxamento evocado pelos análogos **6r** e **6u** não envolve a participação de canais de cálcio e/ou potássio, nem a formação de prostanóides como a prostaciclina.
- V. Em conclusão, nossos resultados sugerem que o análogo **6f** pode servir de base para o desenvolvimento de novos inibidores de PDE5 para o tratamento da disfunção erétil e os análogos **6r** e **6u** podem ser de particular interesse em patologias decorrentes de disfunção endotelial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BOJUK NR, EL-ABADELAH MM, SABRI SS, MICHEL A, VOELTER W, MOSSMER CM, AL-ABED Y. Synthesis and vasorelaxant potency of monagra. A chiral 5-(2-methyl-2,3-dihydro-7-benzofuril) pyrazolopyrimidone analog of viagra. *Heterocycles*. 2001; **55**: 1789-1803.
- ALLERTON CM, BARBER CG, BEAUMONT KC, BROWN DG, COLE SM, ELLIS D, IANE CA, MAW GN, MOUNT NM, RAWSON DJ, ROBINSON CM, STREET SD, SUMMERHILL NW. A novel series of potent and selective PDE5 inhibitors with potential for high and dose-independent oral bioavailability. *J Med Chem*. 2006; **49** (12): 3581-94.
- ANDERSEN CU, MULVANY MJ, SIMONSEN U. Lack of synergistic effect of hypoxic and sildenafil on development of pulmonary hypertension in chronic hypoxic rats. *Eur J Pharmacol*. 2005; **510**: 87-96.
- ARCHER SL. Potassium channels and erectile dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2002; **38**: 61-71.
- BALLARD SA, GINGELL CJ, TANG K, TURNER LA, PRICE ME, NAYLOR AM. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol*. 1998; **159**: 2164-2171.
- BARACAT JS, TEIXEIRA CE, OKUYAMA CE, PRIVIERO FB, FARO R, ANTUNES E, DE NUCCI G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*. 2003; **477**: 163-9.
- BEAVO JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews*. 1995; **75**: 725-748.
- BELLA AJ, DE YOUNG LX, AL-NUMI M, BROCK GB. Daily administration of phosphodiesterase type 5 inhibitors for urological and nonurological indications. *Eur Urol*. 2007; **52**: 990-1005.

- BOOLELL M, ALLEN MJ, BALLARD SA, GEPI-ATTEE S, MUIRHEAD GJ, NAYLOR AM, OSTERLOH IH AND GINGELL C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1996; **8**: 47-52.
- BOUCHER JL, MOALI C, TENU JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 1999; **55**: 1015-1028.
- BUECHLER WA, NAKANE M, MURAD F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; **174**: 351-357.
- COLLIER J AND VALLANCE P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci.* 1989 **10**: 427-431.
- CONTI M, NEMOZ G, SETTE C. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr Rev.* 1995; **16**: 370-389.
- COOPER JD, MUIRHEAD DC, TAYLOR JE AND BAKER PR. Development of an assay for simultaneous determination of sildenafil (Viagra) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1997; **701**: 87-95.
- CORBIN JD AND FRANCIS SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem.* 1999; **274**(20): 13729-13732.
- CORBIN JD AND FRANCIS SH. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int J Clin Pract.* 2002; **56**: 453-459.
- COTE RH. Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. *Int J Impot Res.* 2004; **16** (Suppl. 1): S28-S33.
- DINERMAN JL, LOWENSTEIN CJ AND SNYDER SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation: potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res.* 1993; **73**: 217-222.

- DISHY V, SOFOWORA G, HARRIS PA, KANDCER M, ZHAN F, WOOD AJ, STEIN CM. The effect of sildenafil on nitric oxide-mediated vasodilation in healthy men. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; **70**: 270-9.
- FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H AND STUEHR DJ. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem.* 1993; **36**: 491-496.
- FERRER MJ, MARÍN J, ENCABO A, ALONSO MJ, BALFAGON G. Role of K₁ channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta. *General Pharmacology.* 1999; **33**: 35-41.
- FORESTA C, CARETTA N, ZUCCARELLO D, POLETTI A, BIAGIOLI A, CARETTI L, GALAN A. Expression of the PDE5 enzyme on human retinal tissue: new aspects of PDE5 inhibitors ocular side effects. *Eye.* 2008; **22**(1): 144-9.
- FÖRSTERMANN U AND KLEINERT H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995; **352**: 351-364.
- FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I AND KLEINERT H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994; **23**: 1121-1131.
- FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP AND KLEINERT H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J,* 1998; **12**: 773-790.
- FRANCIS SH, LINCOLN TM, CORBIN JD. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J Biol Chem.* 1980; **255**: 620-6.
- FUKUTO JM AND CHAUDHURI G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 1995; **35**: 165-194.

- FURCHGOTT RF & VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J*, 1989 (**9**): 2007-18.
- FURCHGOTT RF & ZAWADSKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle to acetylcholine. *Nature*, 1980, **288**: 373-376.
- GARLAND CM, FOREMAN RC, CHAD JE, HOLDEN-DYE L, WALKER RJ. The actions of muscle relaxants at nicotinic acetylcholine receptor isoforms. *Eur J Pharmacol*. 1998; **357**: 83-92.
- GARTHWAITE J, SOUTHAM E, BOULTON CL, NIELSEN EB, SCHMIDT K AND MAYER B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*. 1995; **48**: 184-188.
- GERZER R, RADANY EW AND GARBERS DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982; **108**: 678-686.
- GIULIANO F, BERNABE J, ALEXANDRE L, NIEWOEHNER U, HANING H AND BISCHOFF E. Pro-erectile effect of vardenafil: in vitro experiments in rabbits and in vivo comparison with sildenafil in rats. *Eur Urol*. 2003; **44**: 731-736.
- GOLDSTEIN I, LUE TF, PADMA-NATHAN H, ROSEN RC, STEERS WD AND WICKER PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil study group. *New Engl J Med*. 1998; **338**: 1397-1404.
- GHOFRANI HA AND GRIMMINGER F. Treatment of pulmonary arterial hypertension: phosphodiesterase-5 inhibitors. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006; **131**: S311-4.
- HARTENECK C, KOESLING D, SOLING A, SCHULTZ G AND BOHME E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett*. 1990; **272**: 221-223.
- HOBBS AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*. 1997; **18**: 484-491.

- HOROWITZ A, MENICE CB, LAPORTE R, MORGAN KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 1996; **76** (4): 967-1003.
- HUSSAIN AS, MARKS GS, BRIEN JF, NAKATSU K. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ) inhibits relaxation of rabbit aortic rings induced by carbon monoxide, nitric oxide, and glyceryl trinitrate. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; **75**: 1034-7.
- IGNARRO LJ, DEGNAN JN, BARICOS WH, KADOWITZ PJ, WOLIN MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta.* 1982; **718**: 49-59.
- IGNARRO LJ AND MURAD F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology.* 1995; **34**: 1-516, Academic Press.
- IGNARRO LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* 2002; **53**: 503-514.
- JEREMY JY, BALLARD SA, NAYLOR AM, MILLER MA, ANGELINI GD. 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.* 1997; **79**: 958-963.
- JI HH, SHIM HJ, YOO M, PARK E-S, LEE HS. Transport of a new erectogenic udenafil in caco-2 cells. *Arch Pharm Res.* 2007; **9**: 1168-1173.
- KARAKI H, OZAKI H, HORI M, MITSUI-SAITO M, AMANO K, HARADA K, MIYAMOTO S, NAKAZAWA H, WON KJ, SATO K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 1997; **49**: 157-230.
- KERWIN JF, LANCASTER JR, FELDMAN PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem.* 1995; **38**: 4343-4362.

- KIM DK, LEE N, LEE JY, RYU DH, KIM JS, LEE SH, CHOI JY, CHANG K, KIM YW, IM GJ, CHOI W, KIM T, RYU J, KIM N, LEE K. Synthesis and phosphodiesterase 5 inhibitory activity of novel phenyl ring modified sildenafil analogues. *Bioorg Med Chem.* 2001a; **9**: 1609-1616.
- KIM DK, RYU DH, LEE N, LEE JY, KIM JS, LEE S, CHOI JY, RYU JH, KIM NH, IM GJ. Synthesis and phosphodiesterase 5 inhibitory activity of new 5-phenyl-1,6-dihydro-7*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one derivatives containing an *N*-acylamido group on a phenyl ring. *Bioorg Med Chem.* 2001b; **9**: 1895-1899.
- KIM DK, LEE JY, LEE N, RYU DH, KIM JS, LEE S, CHOI JY, RYU JH, KIM NH, IM GJ, CHOI WS, KIM TK. Synthesis and phosphodiesterase inhibitory activity of new sildenafil analogues containing a carboxylic acid group in the 5'-sulfonamide moiety of a phenyl ring. *Bioorg Med Chem.* 2001c; **9**: 3013-3021.
- KLONER RA, HUTTER AM, EMMICK JT, MITCHELL MI, DENNE J AND JACKSON G. Time course of the interaction between tadalafil and nitrates. *J Am Coll Cardiol.* 2003; **42**: 1855-1860.
- KNOWLES RG AND MONCADA S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J.* 1994; **298**: 249-258.
- KOESLING D, BOHME E, SCHULTZ G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 1991; **5**: 2785-2791.
- KOTERA J, FUJISHIGE K, IMAI Y, KAWAI E, MICHIBATA H, AKATSUKA H, YANAKA N, OMORI K. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur J Biochem.* 1999; **262**: 866-73.
- KURIYAMA H, KITAMURA K AND NABATA H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev.* 1995; **47**: 387-573.

- LAGAUD GJL, ANDRIAMBOAVONJY R, ROUL G, STOCLET JC, ANDRIANTSITOHAINA R. Mechanism of Ca²⁺ release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. Mechanism of Ca²⁺ release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol.* 1999; **276**: H300-8.
- LAU LC AND ADAIKAN PG. Mechanisms of direct relaxant effect of sildenafil, tadalafil and vardenafil on corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol.* 2006; **541**: 184-190.
- LIN CS, LAU A, TU R AND LUE TF. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; **268**: 628-35.
- LINCOLN TM, HALL CL, PARK CR, CORBIN JD. Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate binding proteins in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; **73**: 2559-63.
- LOUGHNEY K, HILL TR, FLORIO VA, UHER L, ROSMAN GJ, WOLDA SL, JONES BA, HOWARD ML, MCALLISTER-LUCAS LM, SONNENBURG WK, FRANCIS SH, CORBIN JD, BEAVO JA. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene.* 1998; **216**:139-147.
- LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP AND WALDMAN SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev,* 2000; **52**: 375-414.
- MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD AND WISHNOK JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 1988; **27**: 8706-8711.
- MARLETTA MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol.* 1988; **1**: 249-257.

- MARLETTA MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; **268**: 12231-12234.
- MAURICE DH, PALMER D, TILLEY DG, DUNKERLEY HÁ, NETHERTON SJ, RAYMOND DR, ELBATARNY HS, JIMMO SL. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity expression and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol.* 2003; **64**: 533-546.
- MAYER B AND ANDREW P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; **358**: 127-133.
- MISSIAEN L, TAYLOR CW, BERRIDGE MJ. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature.* 1991; **352**: 241-4.
- MOCHIDA H, INOUE H, TAKAGI M, NOTO T, YANO K AND KIKKAWA K. Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2002; **440**: 45-52.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; **43**: 109-142.
- MORALES A, GINGELL C, COLLINS M, WICKER PA AND OSTERLOH IH. Clinical safety oral sildenafil citrate (Viagra) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Import Res.* 1998; **10**: 69-74.
- MORELAND RB, GOLDSTEIN I AND TRAISH A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Life Sci.* 1998; **62**: 309-318.
- MORENO L, LOSADA B, COGOLLUDO A, LODI F, LUGNIER C, VILLAMOR E, MORO M, TAMARGO J AND PEREZ-VIZCAINO F. Postnatal maturation of phosphodiesterase 5 (PDE5) in piglet pulmonary arteries: activity, expression, effects of PDE5 inhibitors, and role of the nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Pediat Res.* 2004; **56**: 563-570.

- MULLERSHAUSEN F, RUSSWURM M, FRIEBE A, KOESLING D. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation*. 2004; **14**: 1711-3.
- MURAD F. Role of cyclic GMP in the mechanism of action of nitrovasodilators, endothelium-dependent agents and atrial natriuretic peptide. *Biochem Soc Trans*. 1988; **16**: 490-2.
- MURPHY RA, WALKER JS. Inhibitory mechanisms for cross-bridge cycling: the nitric oxide-cGMP signal transduction pathway in smooth muscle relaxation. *Acta Physiol Scand*. 1998; **164**: 373-380.
- NICHOLS DJ, MUIRHEAD GJ, HARNESS JA. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br J Clin Pharmacol*. 2002; **53**: 5S-12S.
- OHLSTEIN EH, WOOD KS AND IGNARRO LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys*. 1982; **218**: 187-198.
- ONOUE H, KATUSIC ZS. Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke*. 1997; **28**: 1264-70.
- PHILLIPS S, GBEKOR E, BETHEL S. Selectivity of sildenafil and other phosphodiesterases Type 5 (PDE5) inhibitors against all human phosphodiesterase families. Abstract presented at EUA, Birmingham 2002.
- PRIETO D, SIMONSEN U, HERNANDEZ M, GARCIA-SACRISTAN A. Contribution of K⁺ channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br J Pharmacol*. 1998; **123**(8): 1609-20.
- RAPOPORT RM AND MURAD F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983; **52**: 352-357.
- REMBOLD CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*. 1992; **20**(2): 129-37.

- ROBERTSON BE, SCHUBERT R, HESCHELER J, NELSON MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993; **265**: C299-C303.
- RUBIO F, GASSMANN W, SCHROEDER JI. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science.* 1995; **270**: 1660-3.
- RYBALKIN SD, YAN C, BORNFELDT KE, BEAVO JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 2003; **93**: 280-291.
- SAKUMA I, AKAISHI Y, TOMIOKA H, SATO A, KITABATAKE A, HATTORI Y. Interactions of sildenafil with various coronary vasodilators in isolated porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol.* 2002; **437**: 155-63.
- SALOM JB, BURGUETE MC, PÉREZ-ASENCIO FJ, CASTELLÓ-RUIZ M, TORREGROSA G, ALBORCH E. Relaxant effect of sildenafil in the rabbit basilar artery. *Vascul Pharmacol.* 2006, **44**(1):10-6
- SAMPSON LJ, HINTON JM AND GARLAND CJ. Evidence for expression and function of phosphodiesterase type 5 (PDE-V) in rat resistance arteries. *Br J Pharmacol.* 2001; **132**: 13-17.
- SCHULZ S, YUEN OS AND GARBERS DL. The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; **12**: 116-120.
- SHARABI FM, DAABEES TT, EL-METWALLY MA AND SENBEL AM. Effect of sildenafil on the isolated rat aortic rings. *Fund & Clin Pharmac.* 2005; **19**: 449-456.
- SHIMIZU-ALBERGINE M, RYBALKIN SD, RYBALKINA IG, FEIL R, WOLFSGRUBER W, HOFMANN F, AND BEAVO JA. Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci.* 2003; **23**: 6452-6459.

- SIMONSEN U, PRIETO D, SAENZ DE TEJADA I, GARCIA-SACRISTAN A. Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K⁺-channels. *Br J Pharmacol.* 1995; **116**: 2582-2590.
- SODERLING SH AND BEAVO JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; **12**: 174-179.
- STASCH JP, BECKER EM, ALONSO-ALIJA C, APELER H, DEMBOWSKY K, FEURER A, GERZER R, MINUTH T, PERZBORN E, PLEISS U, SCHRODER H, SCHROEDER W, STAHL E, STEINKE W, STRAUB A AND SCHRAMM M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001; **410**: 212-215.
- STASCH JP, ALONSO-ALIJA C, APELER H, DEMBOWSKY K, FEURER A, MINUTH T, PERZBORN E, SCHRAMM M, STRAUB A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol.* 2002; **135**: 333-343.
- STONE JR, MARLETTA MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry.* 1994; **33**: 5636-40.
- SUNG BJ, HWANG KY, JEON YH, LEE JI, HEO YS, KIM JH, MOON J, YOON JM, HYUN YL, KIM E, EUM SJ, PARK SY, LEE JO, LEE TG, RO S, CHO JM. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature.* 2003; **425**: 98-102.
- TANIGUCHI J, FURUKAWA KI AND SHIGEKAWA M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 1993; **423**: 167-172.
- TEIXEIRA CE, PRIVIERO FBM, AND WEBB RC. Differential Effects of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Rat Aorta. *J Pharm And Exper Therap.* 2006; **316**: 654-661.

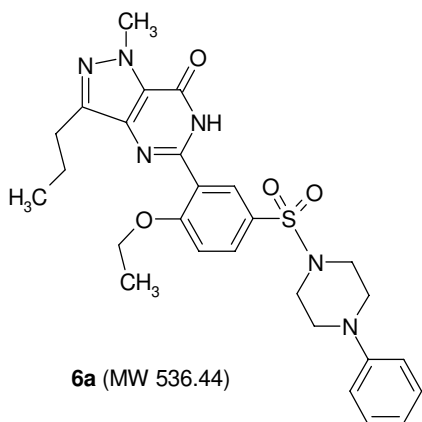
- TEXEIRA MM, GRISTWOOD RW, COOPER N. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? TIPS. 1997; **18**:164-170.
- TOQUE HA, TEIXEIRA CE, LORENZETTI R, OKUYAMA CE, ANTUNES E, DE NUCCI. Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. Eur J Pharm. 2008a, **591**: 189-195.
- TOQUE HA, TEIXEIRA CE, PRIVIERO FB, MORGANTI RP, ANTUNES E, DE NUCCI G. Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium-channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. Br. J. Pharmacol. 2008 **154**: 787-796.
- THORPHY TJ. Phosphodiesterase isozymes. Molecular targets for novel antiasthma agents. Am J Respir Crit Care Med. 1998; **157**: 351-370.
- TRUSS MC, STIEF CG. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. Drugs Today. 1998; **34**: 805.
- WAGNER G. Analysis of the efficacy of sildenafil (Viagra) in the treatment of male erectile dysfunction. J Urol. 1998; **159**: 239(abstr.910).
- WARRINGTON JS, VON MOLTKE LL, SHADER RI, GREENBLATT DJ. In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra) in the male rat: the role of CYP2C11. Drug Metab. Dispos. 2002; **6**: 655-657.
- WEBB DJ, MUIRHEAD GJ, WULFF M, SUTTON JA, LEVI R AND DINSMORE WW. Sildenafil citrate potentiates the hypotensive effects of nitric oxide donor drugs in male patients with stable angina. J Am Coll Cardiol. 2000; **36**: 25-31.
- WEDEL B, HUMBERT P, HARTENECK C, FOERSTER J, MALKEWITZ J, BOHME E, SCHULTZ G AND KOESLING D. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; **91**: 2592-2596.

WRIGHT PJ. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *Int J Clin Pract.* 2006;
60(8): 967-75.

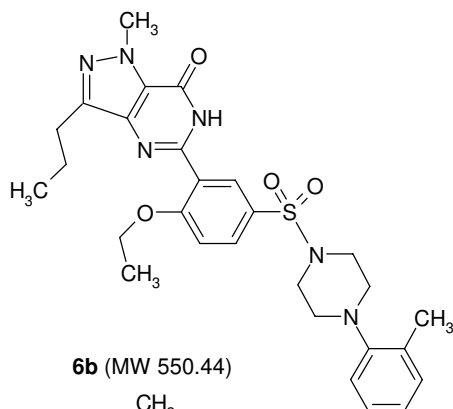
7. APÊNDICE

Apêndice A

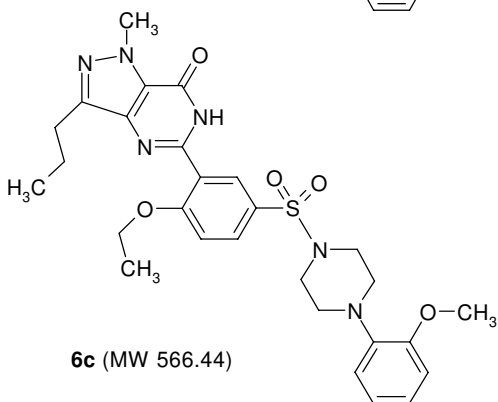
Estrutura dos vinte análogos do sildenafil (**6a-v**).



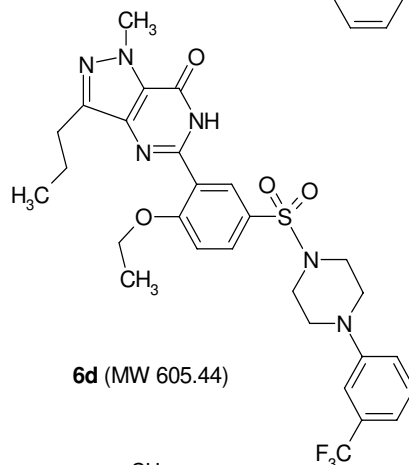
6a (MW 536.44)



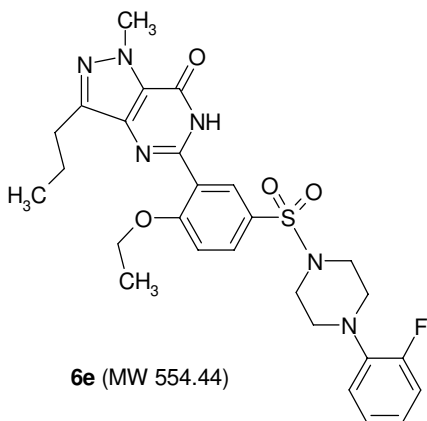
6b (MW 550.44)



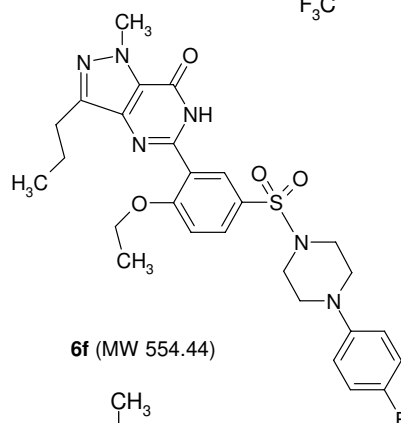
6c (MW 566.44)



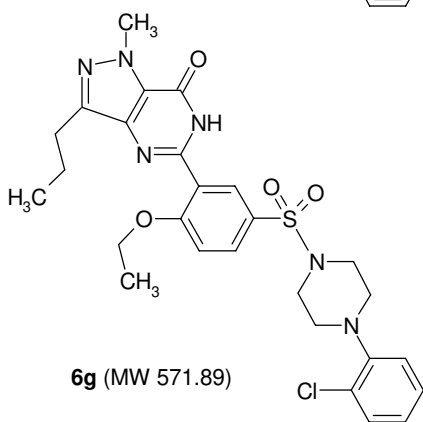
6d (MW 605.44)



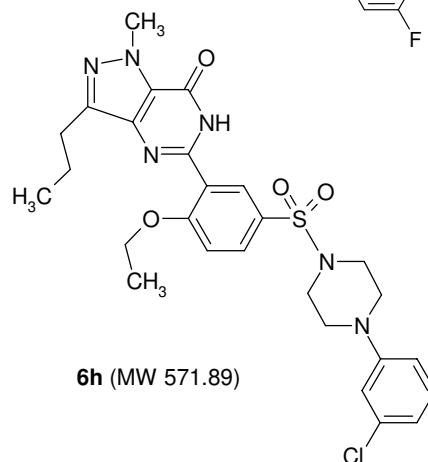
6e (MW 554.44)



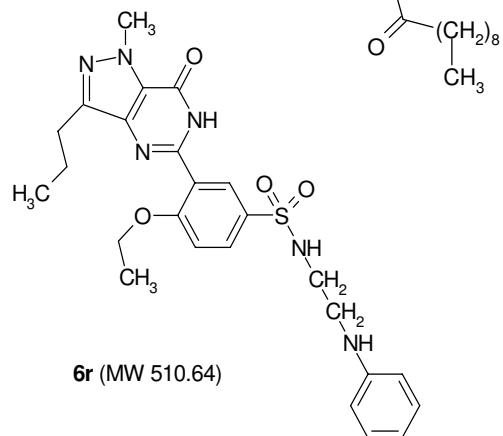
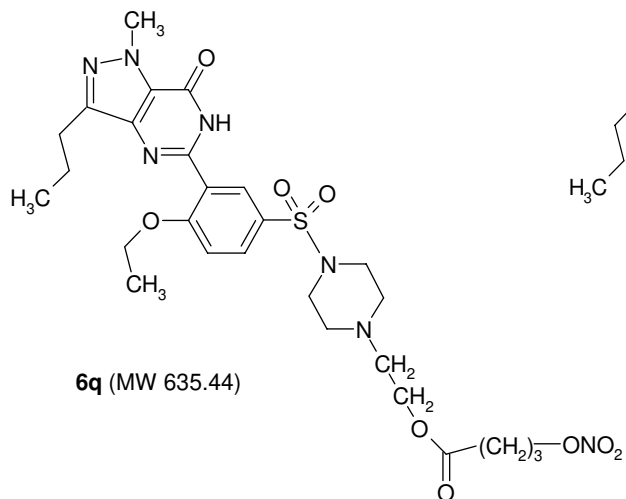
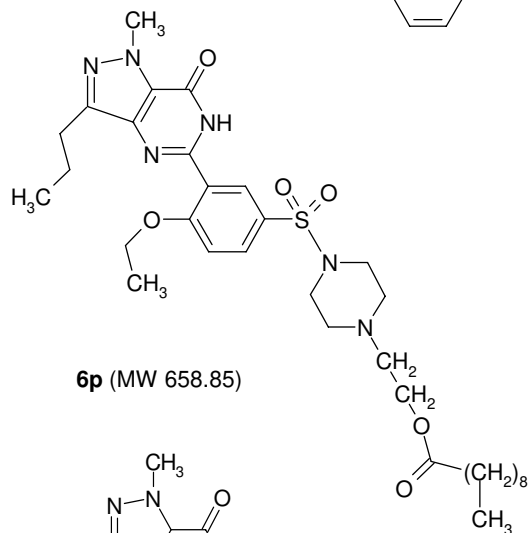
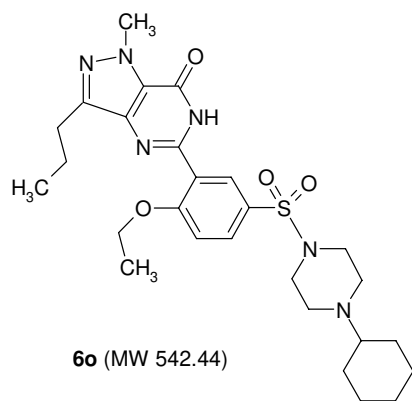
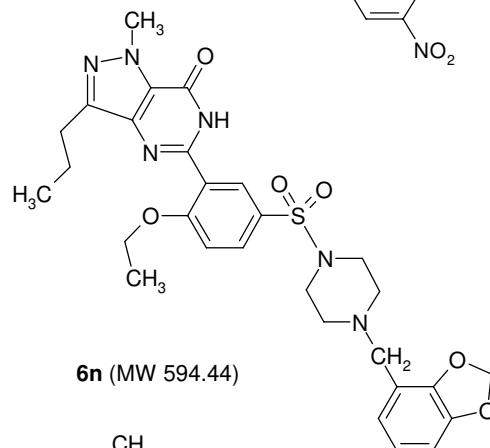
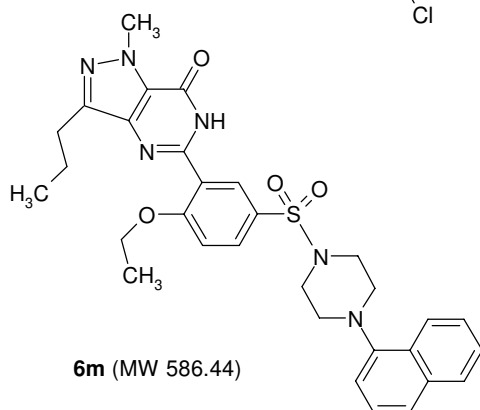
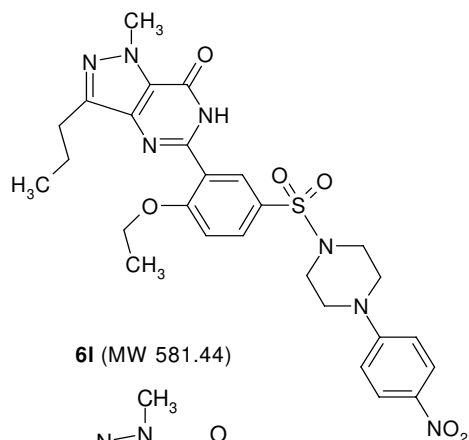
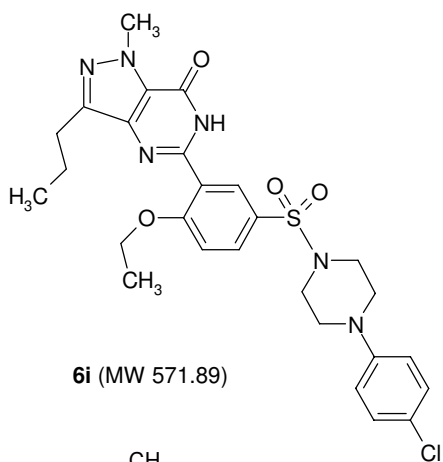
6f (MW 554.44)

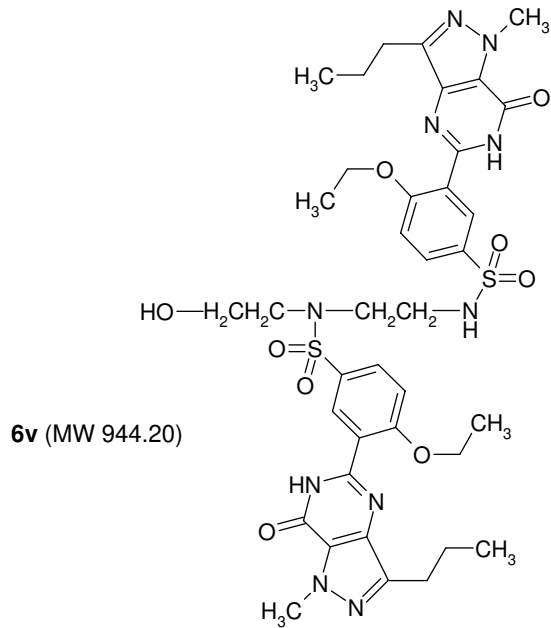
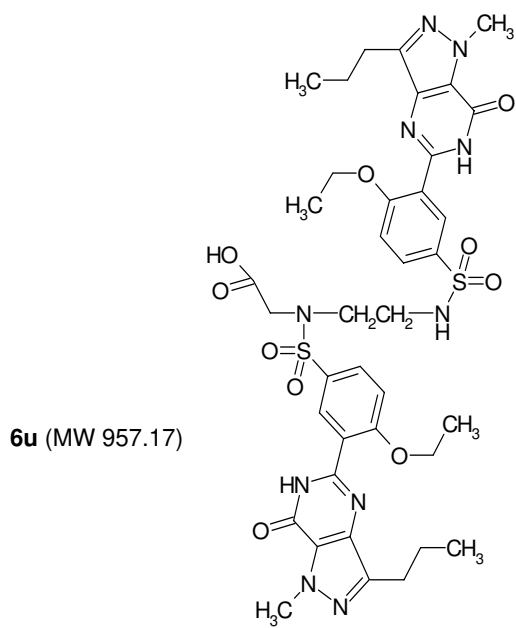
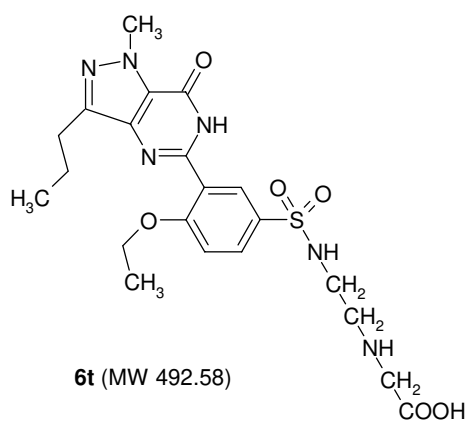
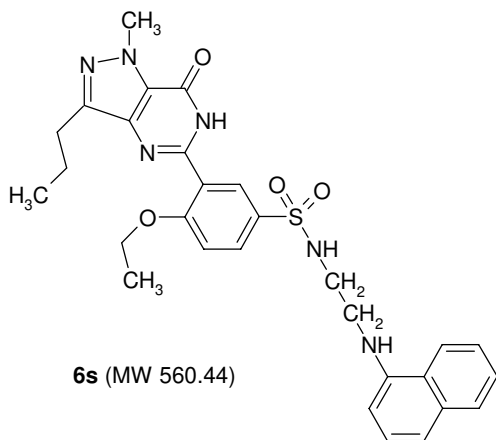


6g (MW 571.89)



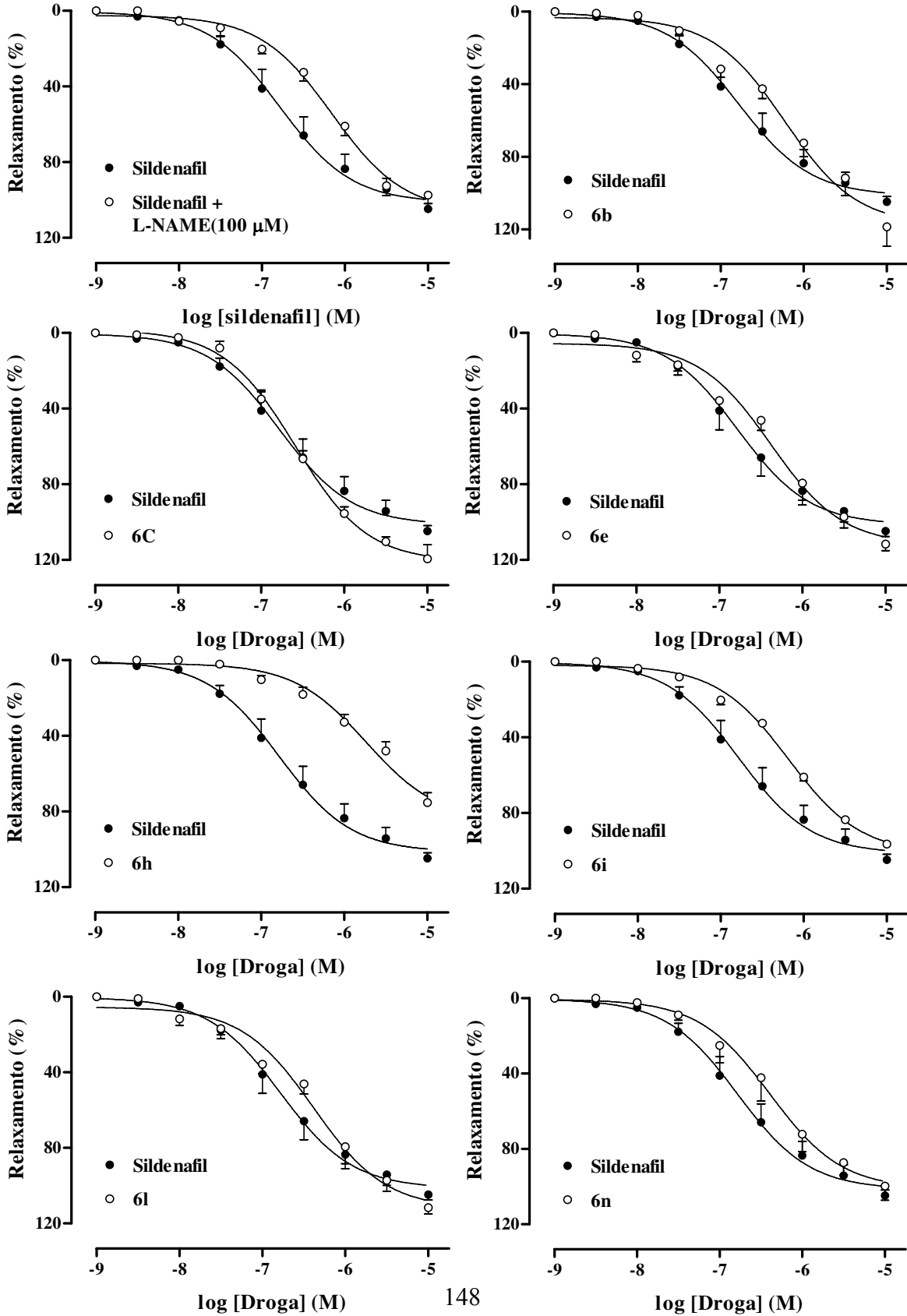
6h (MW 571.89)





Apêndice B

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil no corpo cavernoso de coelho.



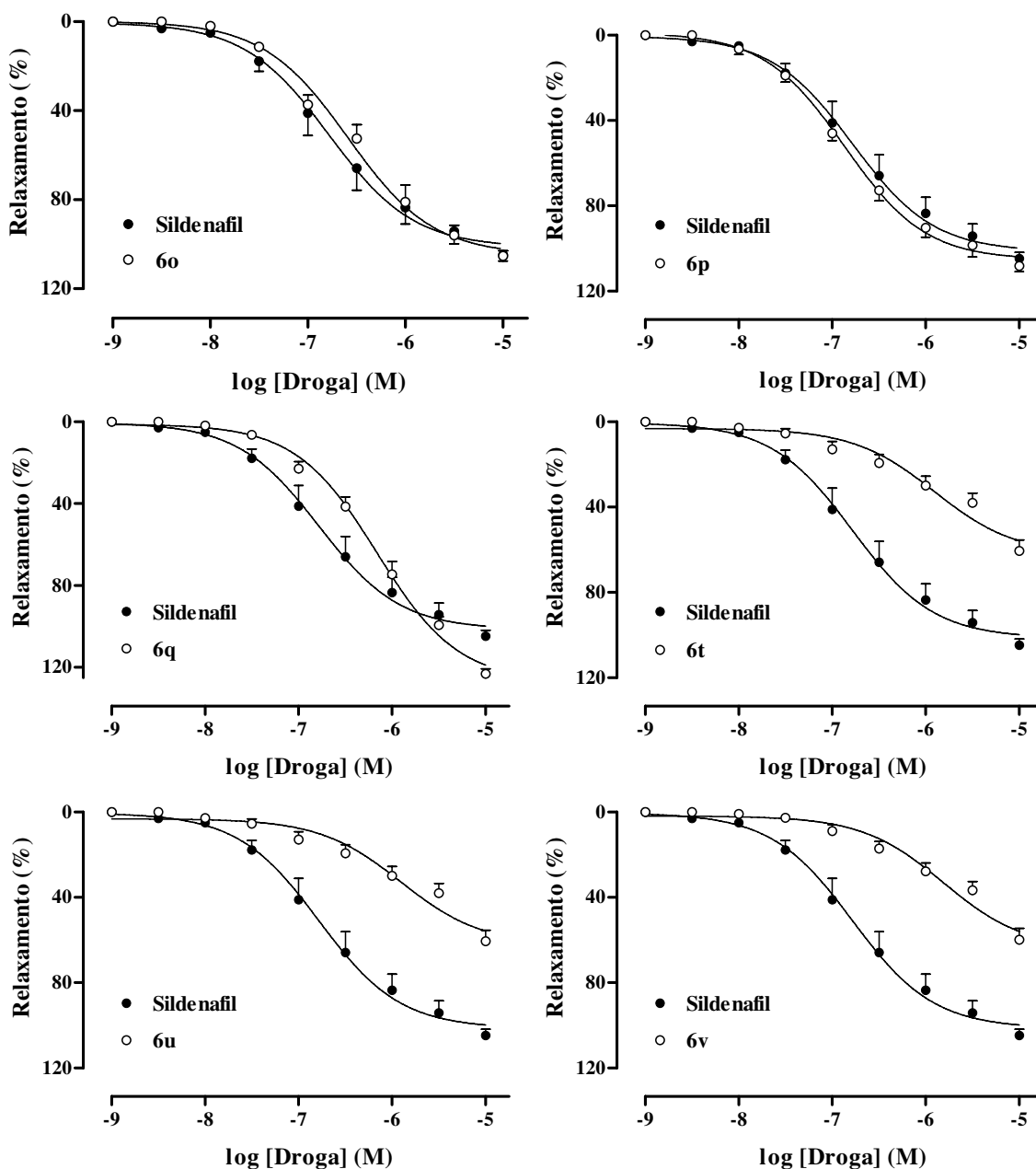
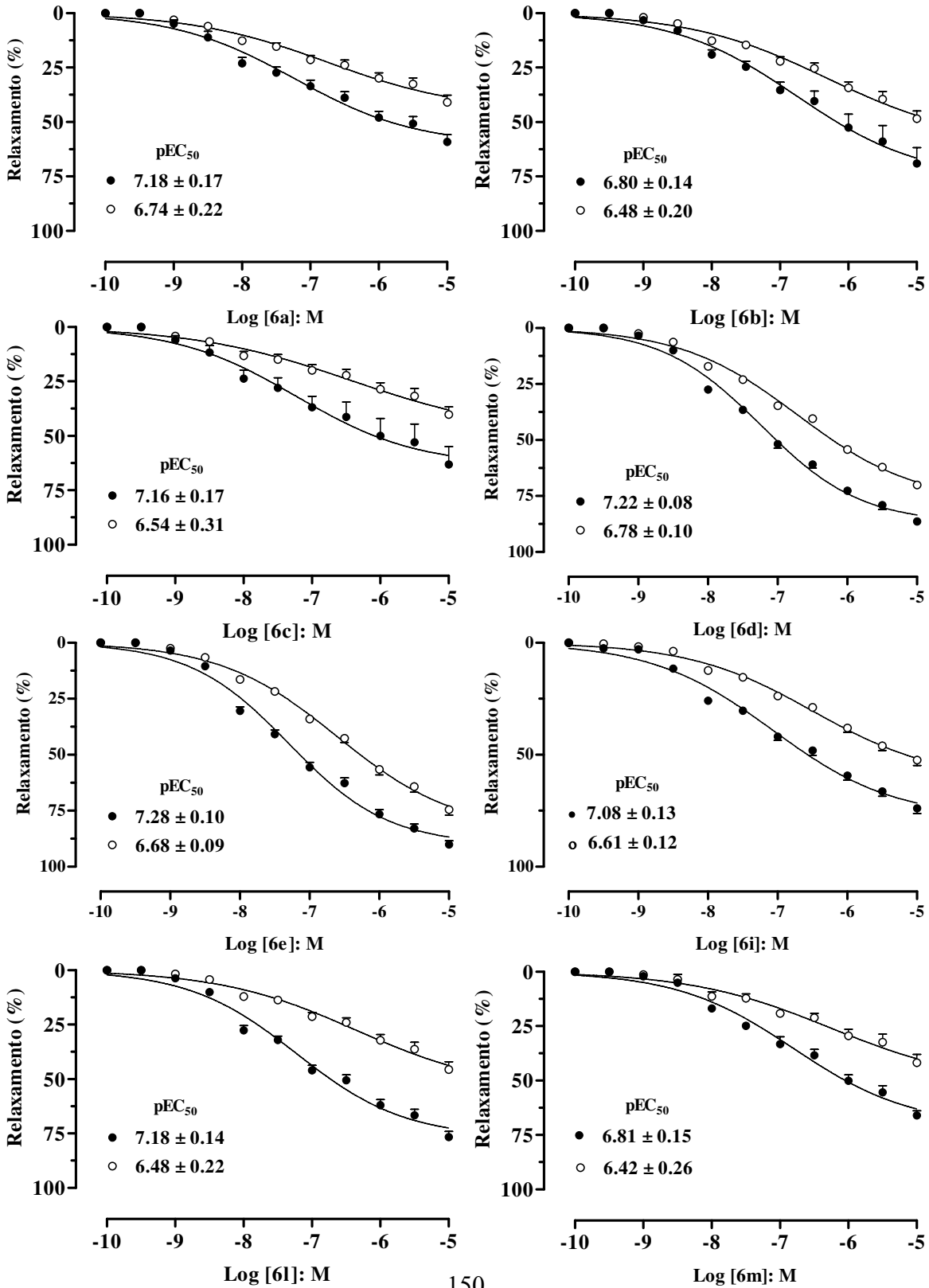


Figura B. Curvas concentração-efeito (0,001–10 μ M; n=4) ao sildenafil e análogos do sildenafil em corpo cavernoso de coelho. Os valores representam médias \pm E.P.M. de relaxamento calculadas em relação ao tônus induzido pela fenilefrina (10 μ M). A curva ao sildenafil foi repetida em cada painel para facilitar a comparação dos compostos.

Apêndice C

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil em anéis de aorta com endotélio íntegro ou removido.



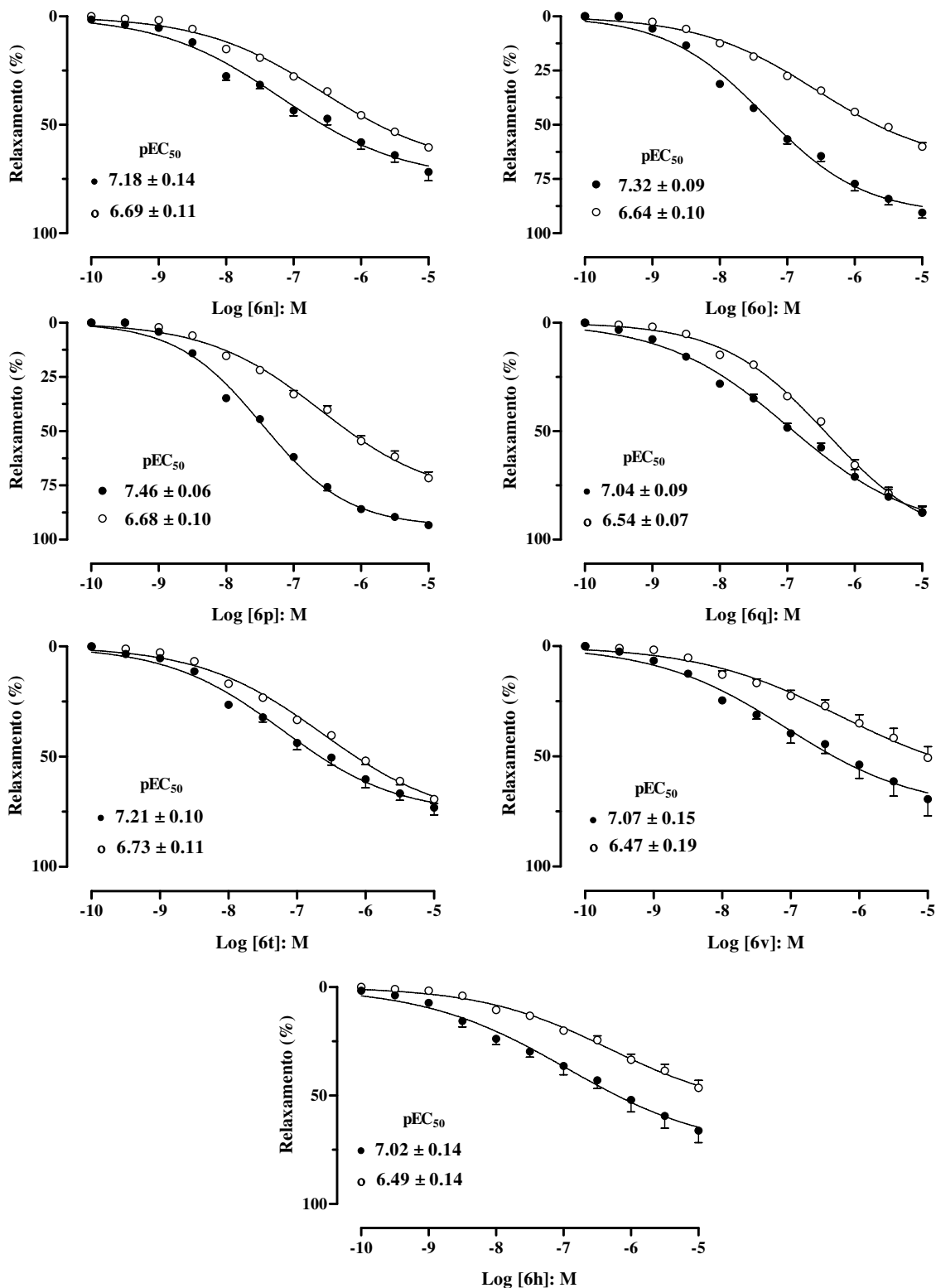


Figura C. Curvas concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta isolada de coelho com endotélio (●) ou removido (○). Os valores representam médias \pm E.P.M. para 5 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

Apêndice D

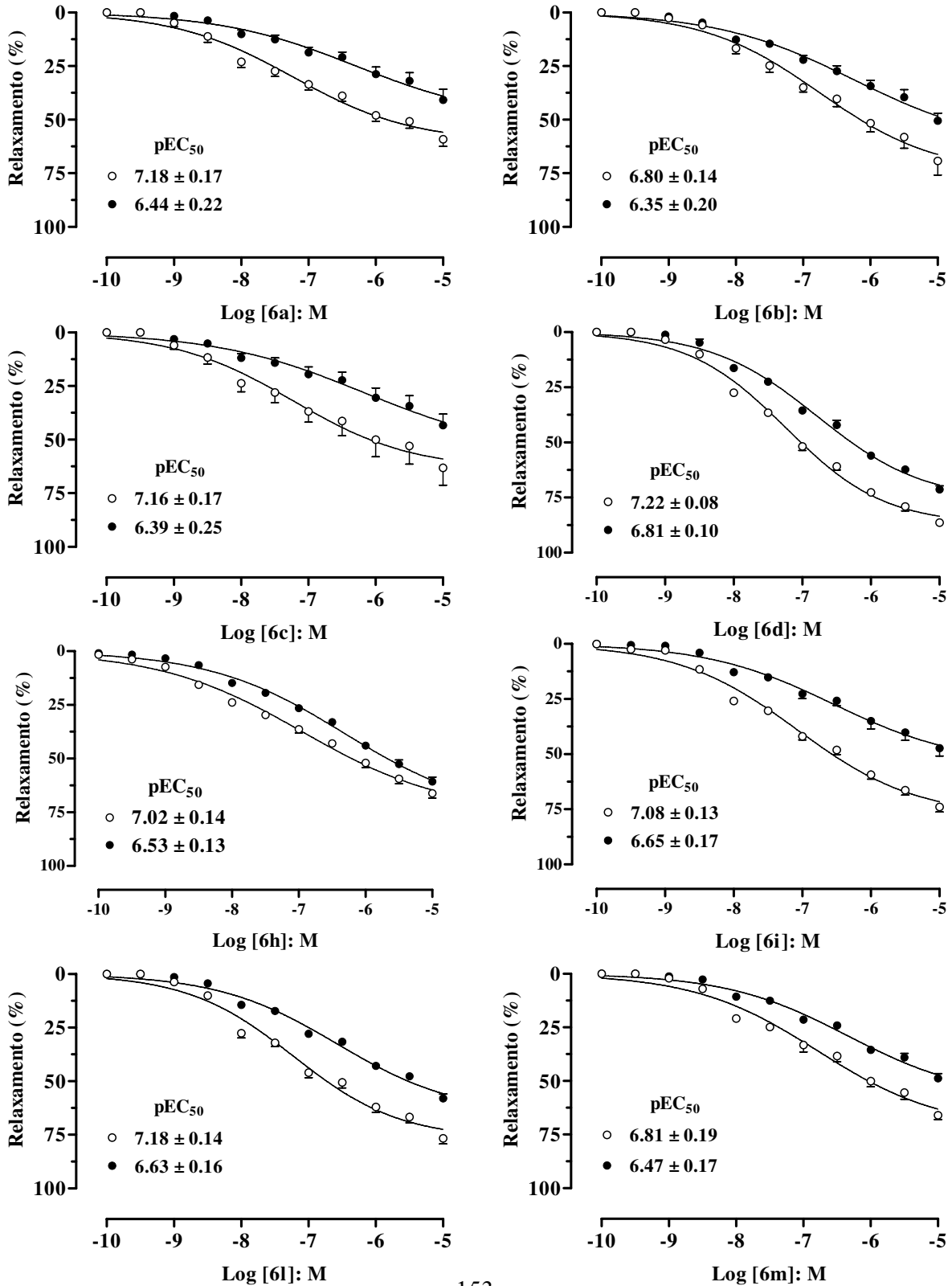
Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio íntegro na ausência ou na presença de L-NAME (100 μ M). *shift* representa o deslocamento à direita provocado pelo inibidor.

	pEC_{50}		<i>Shift</i> †	E_{max} (%)	
	Ausência	Presença		Ausência	Presença
Sildenafil	7,25 \pm 0,07	6,52 \pm 0,13**	5	76 \pm 8	49 \pm 5*
6a	7,18 \pm 0,17	6,44 \pm 0,22**	6	59 \pm 3	41 \pm 5*
6b	6,80 \pm 0,14	6,35 \pm 0,20*	3	69 \pm 9	51 \pm 2
6c	7,16 \pm 0,17	6,39 \pm 0,25**	6	63 \pm 8	43 \pm 5
6d	7,22 \pm 0,08	6,81 \pm 0,10*	3	86 \pm 1	71 \pm 4*
6e	7,28 \pm 0,10	6,45 \pm 0,12**	7	90 \pm 4	62 \pm 4*
6f	7,28 \pm 0,10	6,57 \pm 0,09**	5	89 \pm 3	66 \pm 2**
6g	7,40 \pm 0,06	6,79 \pm 0,09*	4	91 \pm 4	81 \pm 3
6h	7,02 \pm 0,14	6,53 \pm 0,13*	3	66 \pm 6	61 \pm 5
6i	7,08 \pm 0,13	6,65 \pm 0,17*	3	74 \pm 6	47 \pm 4*
6l	7,18 \pm 0,14	6,63 \pm 0,16*	4	77 \pm 3	58 \pm 2*
6m	6,81 \pm 0,19	6,47 \pm 0,17*	3	66 \pm 2	49 \pm 2*
6n	7,18 \pm 0,14	6,60 \pm 0,10*	4	72 \pm 4	68 \pm 4
6o	7,32 \pm 0,09	6,62 \pm 0,09**	5	91 \pm 5	64 \pm 4**
6p	7,46 \pm 0,06	6,70 \pm 0,08**	6	93 \pm 2	65 \pm 4**
6q	7,04 \pm 0,09	6,53 \pm 0,07*	3	87 \pm 3	84 \pm 5
6r	7,21 \pm 0,10	7,11 \pm 0,10	-	82 \pm 4	85 \pm 5
6s	7,28 \pm 0,11	6,69 \pm 0,12*	4	70 \pm 5	60 \pm 4
6t	7,21 \pm 0,10	6,58 \pm 0,15*	4	73 \pm 2	64 \pm 5
6u	6,93 \pm 0,12	6,75 \pm 0,12	-	75 \pm 5	67 \pm 5
6v	7,07 \pm 0,15	6,40 \pm 0,14**	5	69 \pm 8	54 \pm 1

†*shift* provocado pelo L-NAME. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, comparado ao respectivo controle.

Apêndice E

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do L-NAME (100 μ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro.



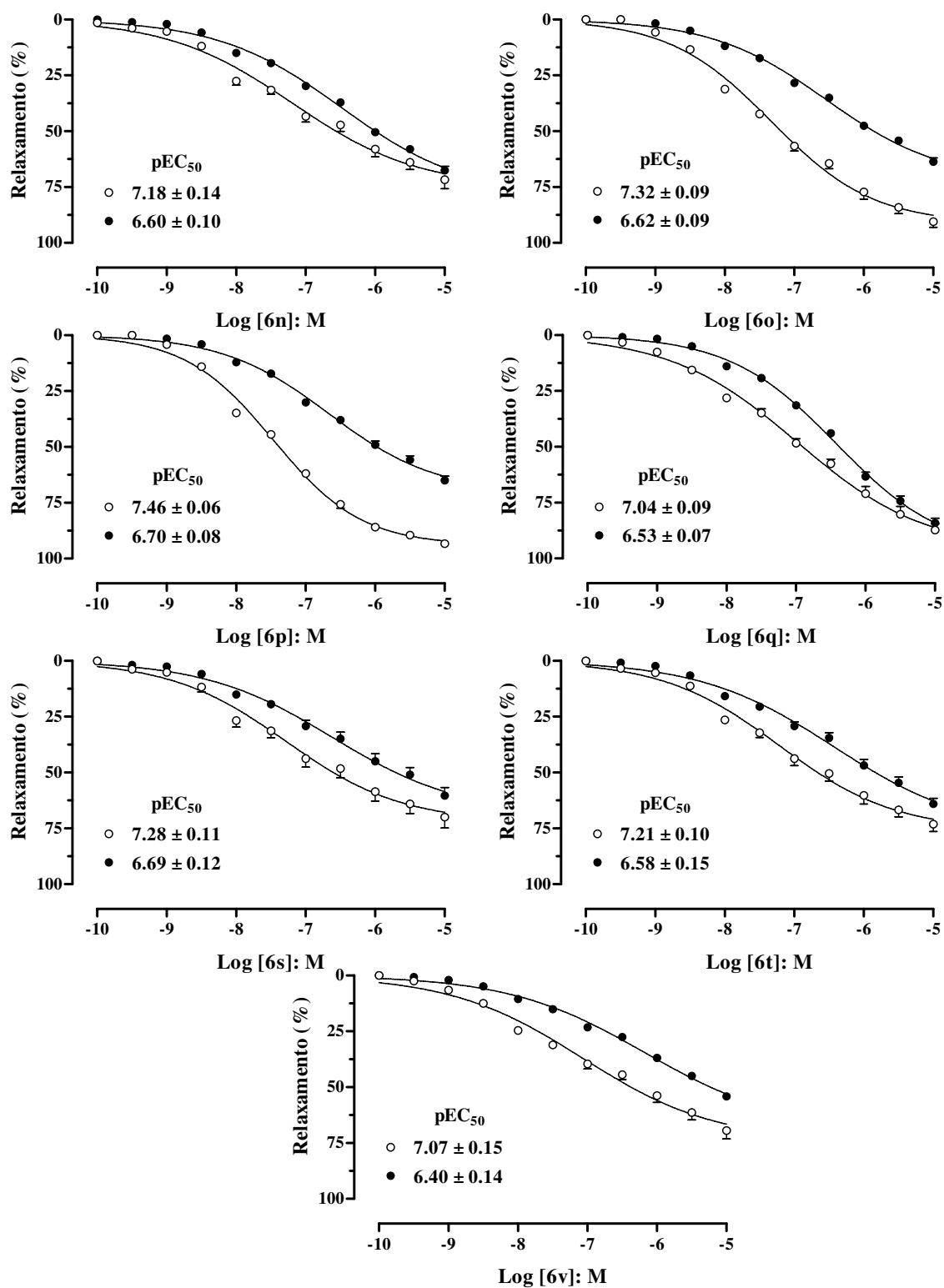


Figura E. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (o) ou na presença (●) de L-NAME (100 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

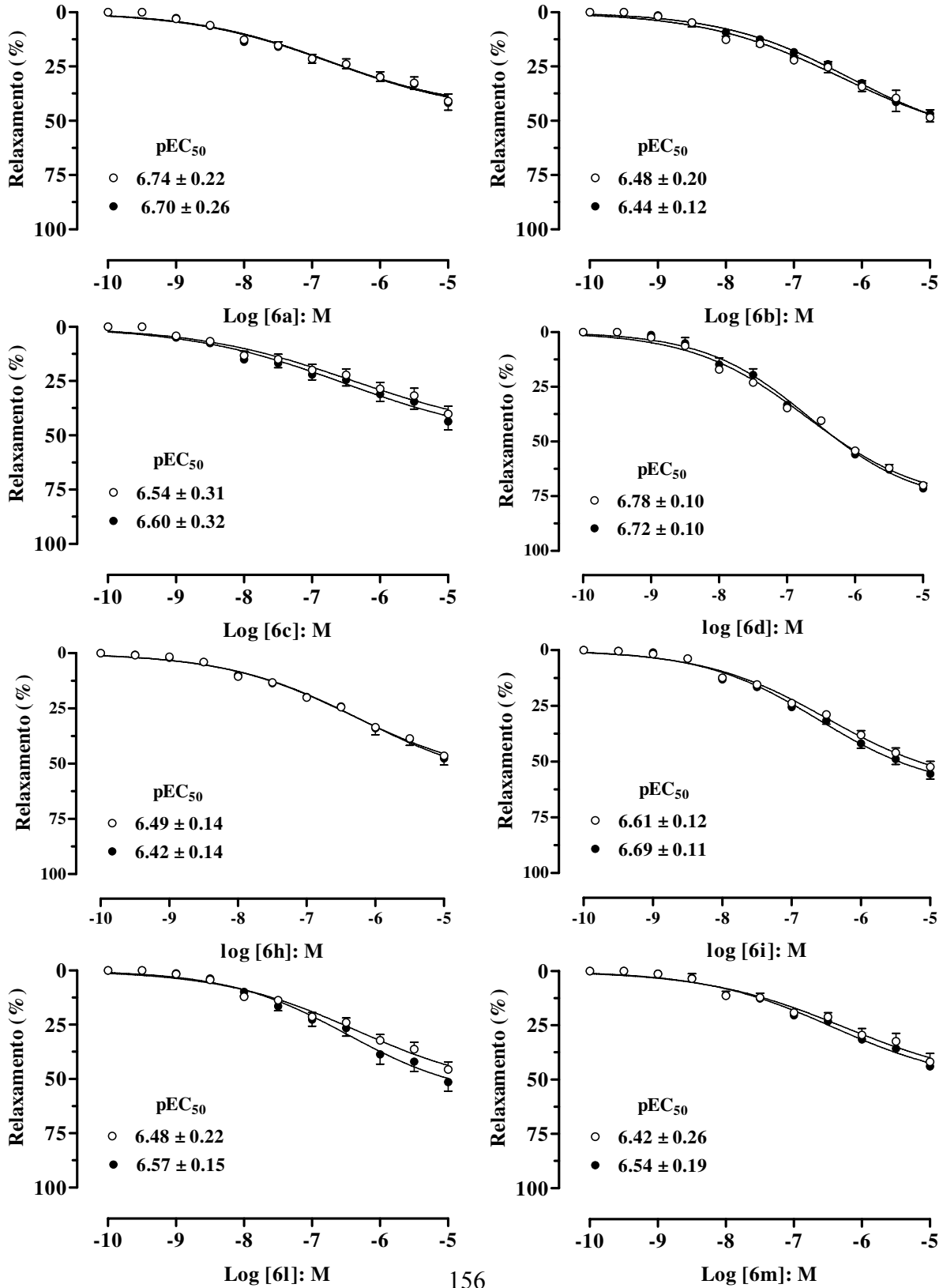
Apêndice F

Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido na ausência ou na presença de L-NAME (100 μ M). Dados representam a média \pm E.P.M para 6-8 experimentos.

	pEC_{50}		E_{max} (%)	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Sildenafil	6,57 \pm 0,11	6,48 \pm 0,21	56 \pm 1	41 \pm 3
6a	6,74 \pm 0,22	6,70 \pm 0,26	41 \pm 3	42 \pm 3
6b	6,48 \pm 0,20	6,44 \pm 0,12	49 \pm 4	47 \pm 4
6c	6,54 \pm 0,31	6,60 \pm 0,32	40 \pm 4	44 \pm 4
6d	6,78 \pm 0,10	6,72 \pm 0,10	70 \pm 3	72 \pm 5
6e	6,68 \pm 0,09	6,53 \pm 0,09	75 \pm 5	69 \pm 3
6f	6,71 \pm 0,10	6,51 \pm 0,11	67 \pm 4	60 \pm 3
6g	6,76 \pm 0,11	6,69 \pm 0,11	73 \pm 4	67 \pm 3
6h	6,49 \pm 0,14	6,42 \pm 0,14	47 \pm 4	48 \pm 4
6i	6,61 \pm 0,12	6,69 \pm 0,11	52 \pm 6	56 \pm 5
6l	6,48 \pm 0,22	6,57 \pm 0,15	46 \pm 4	51 \pm 4
6m	6,42 \pm 0,26	6,54 \pm 0,19	42 \pm 2	44 \pm 2
6n	6,69 \pm 0,11	6,61 \pm 0,12	61 \pm 4	60 \pm 4
6o	6,64 \pm 0,10	6,49 \pm 0,08	60 \pm 4	59 \pm 4
6p	6,68 \pm 0,10	6,57 \pm 0,08	72 \pm 6	70 \pm 6
6q	6,54 \pm 0,07	6,49 \pm 0,07	88 \pm 3	79 \pm 9
6r	7,01 \pm 0,11	7,01 \pm 0,09	82 \pm 3	88 \pm 4
6s	6,75 \pm 0,11	6,82 \pm 0,11	66 \pm 7	70 \pm 3
6t	6,73 \pm 0,11	6,65 \pm 0,11	69 \pm 5	67 \pm 5
6u	6,81 \pm 0,09	6,59 \pm 0,11	68 \pm 7	62 \pm 8
6v	6,47 \pm 0,19	6,37 \pm 0,14	51 \pm 5	47 \pm 5

Apêndice G

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do L-NAME (100 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido.



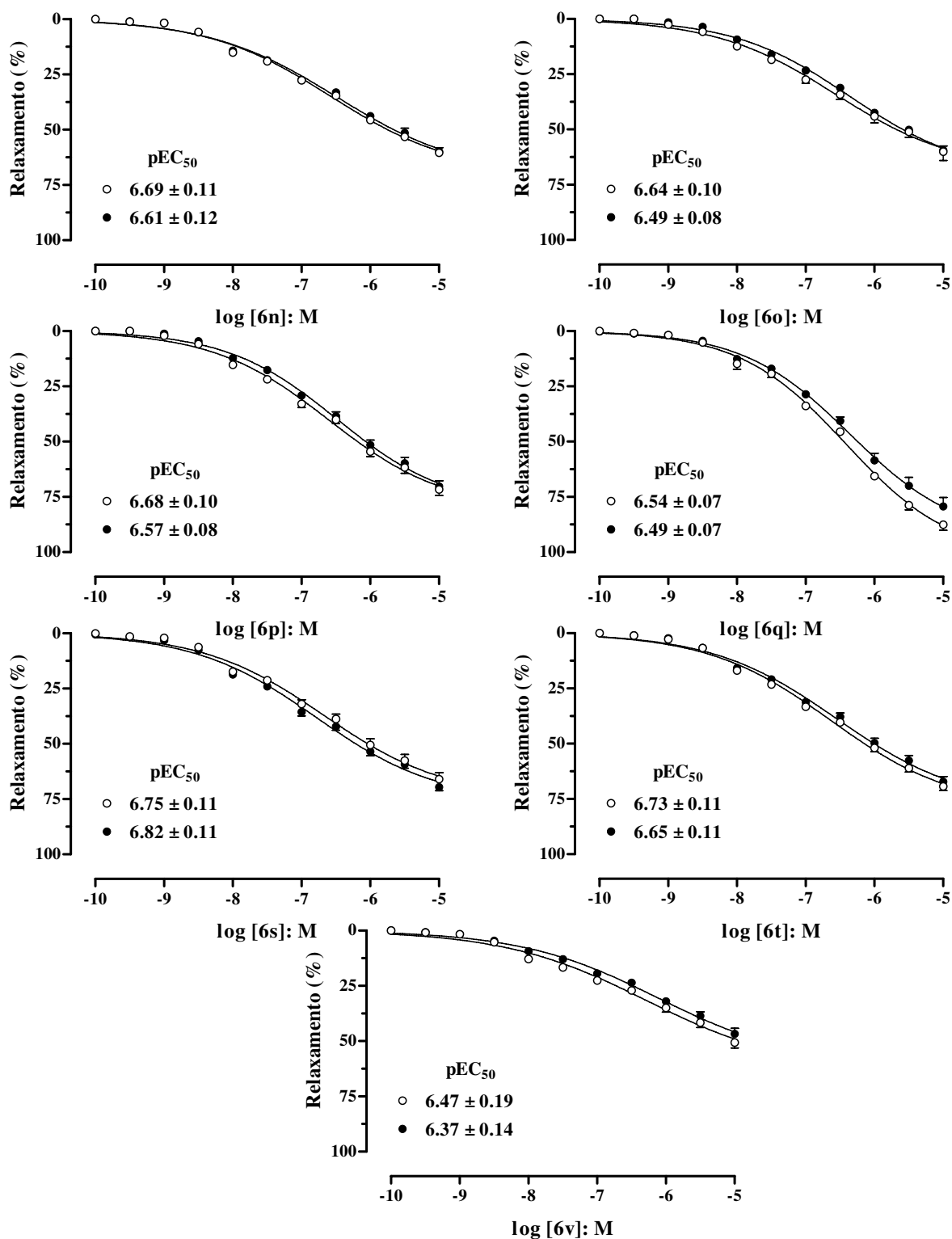


Figura G. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (○) ou na presença (●) de L-NAME (100 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

Apêndice H

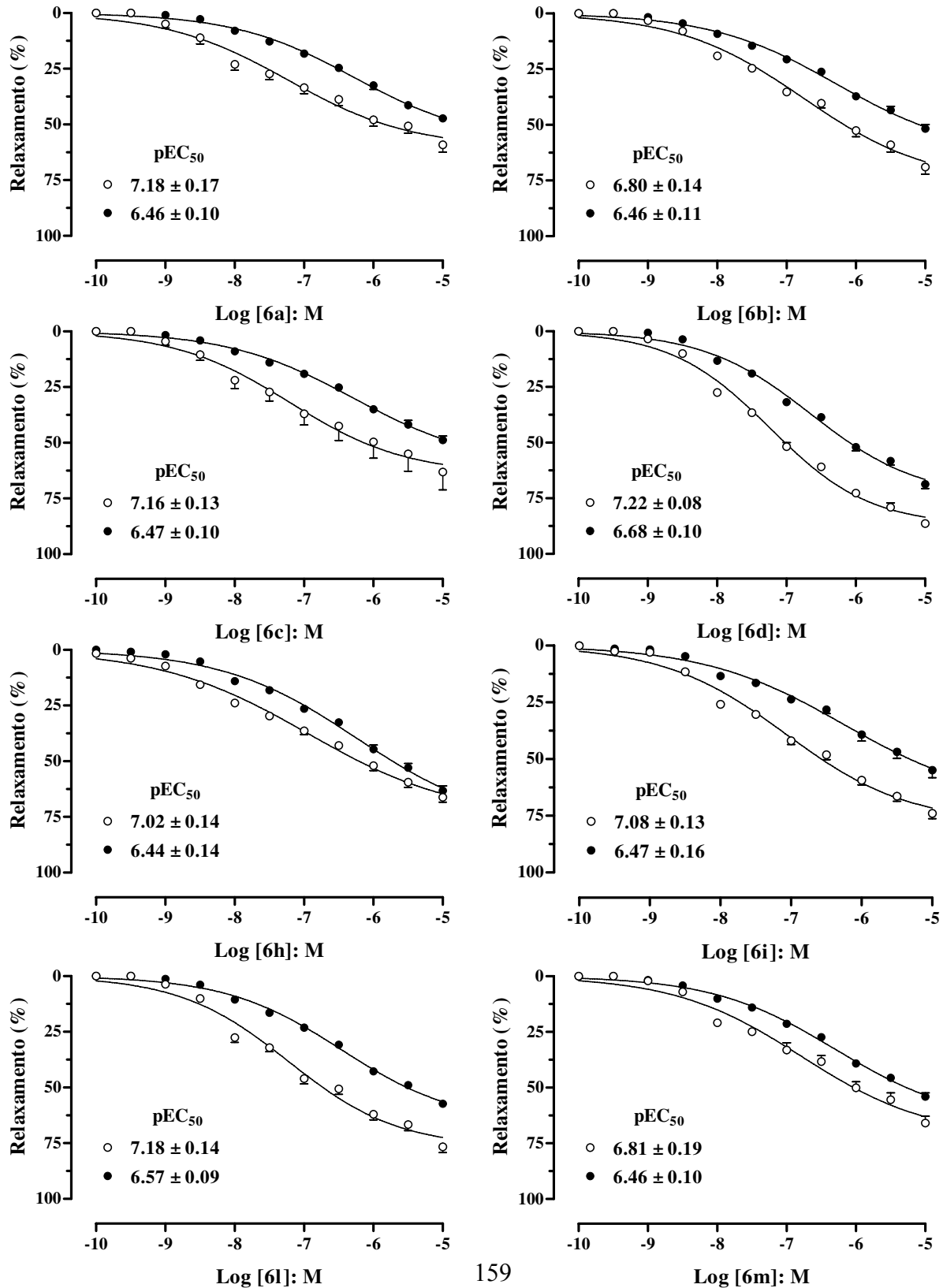
Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio íntegro na ausência ou na presença de ODQ (10 µM). O *shift* representa o deslocamento à direita provocado pelo inibidor.

	pEC ₅₀		<i>Shift</i> †	E _{max} (%)	
	Ausência	Presença		Ausência	Presença
Sildenafil	7,25 ± 0,07	6,51 ± 0,10**	6	76 ± 8	59 ± 3*
6a	7,18 ± 0,17	6,46 ± 0,10*	5	59 ± 3	47 ± 3
6b	6,80 ± 0,14	6,46 ± 0,11*	3	69 ± 9	52 ± 4
6c	7,16 ± 0,17	6,47 ± 0,10*	5	63 ± 8	49 ± 4
6d	7,22 ± 0,08	6,68 ± 0,10*	3	86 ± 1	69 ± 4*
6e	7,28 ± 0,10	6,48 ± 0,11**	6	90 ± 4	63 ± 5**
6f	7,28 ± 0,10	6,55 ± 0,10**	5	89 ± 3	64 ± 3*
6g	7,40 ± 0,06	6,78 ± 0,08*	4	91 ± 4	80 ± 8
6h	7,02 ± 0,14	6,44 ± 0,14*	4	66 ± 6	63 ± 5
6i	7,08 ± 0,13	6,47 ± 0,16*	4	74 ± 6	55 ± 7
6l	7,18 ± 0,14	6,57 ± 0,09*	4	77 ± 3	57 ± 2*
6m	6,81 ± 0,19	6,46 ± 0,10*	3	66 ± 2	54 ± 3*
6n	7,18 ± 0,14	6,67 ± 0,11*	3	72 ± 4	64 ± 3
6o	7,32 ± 0,09	6,40 ± 0,10*	8	91 ± 5	64 ± 5**
6p	7,46 ± 0,06	6,63 ± 0,06**	7	93 ± 2	68 ± 3**
6q	7,04 ± 0,09	6,58 ± 0,08*	3	87 ± 3	74 ± 5
6r	7,21 ± 0,10	7,08 ± 0,09	-	82 ± 4	84 ± 4
6s	7,28 ± 0,11	6,60 ± 0,12*	5	70 ± 5	64 ± 3
6t	7,21 ± 0,10	6,64 ± 0,14*	4	73 ± 2	67 ± 3
6u	6,93 ± 0,12	6,72 ± 0,11	-	75 ± 5	69 ± 5
6v	7,07 ± 0,15	6,40 ± 0,14**	5	69 ± 8	55 ± 3

†*shift* provocado pelo ODQ. *P<0,05; P<0,01, comparado ao seu respectivo controle.

Apêndice I

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do ODQ (10 μ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro.



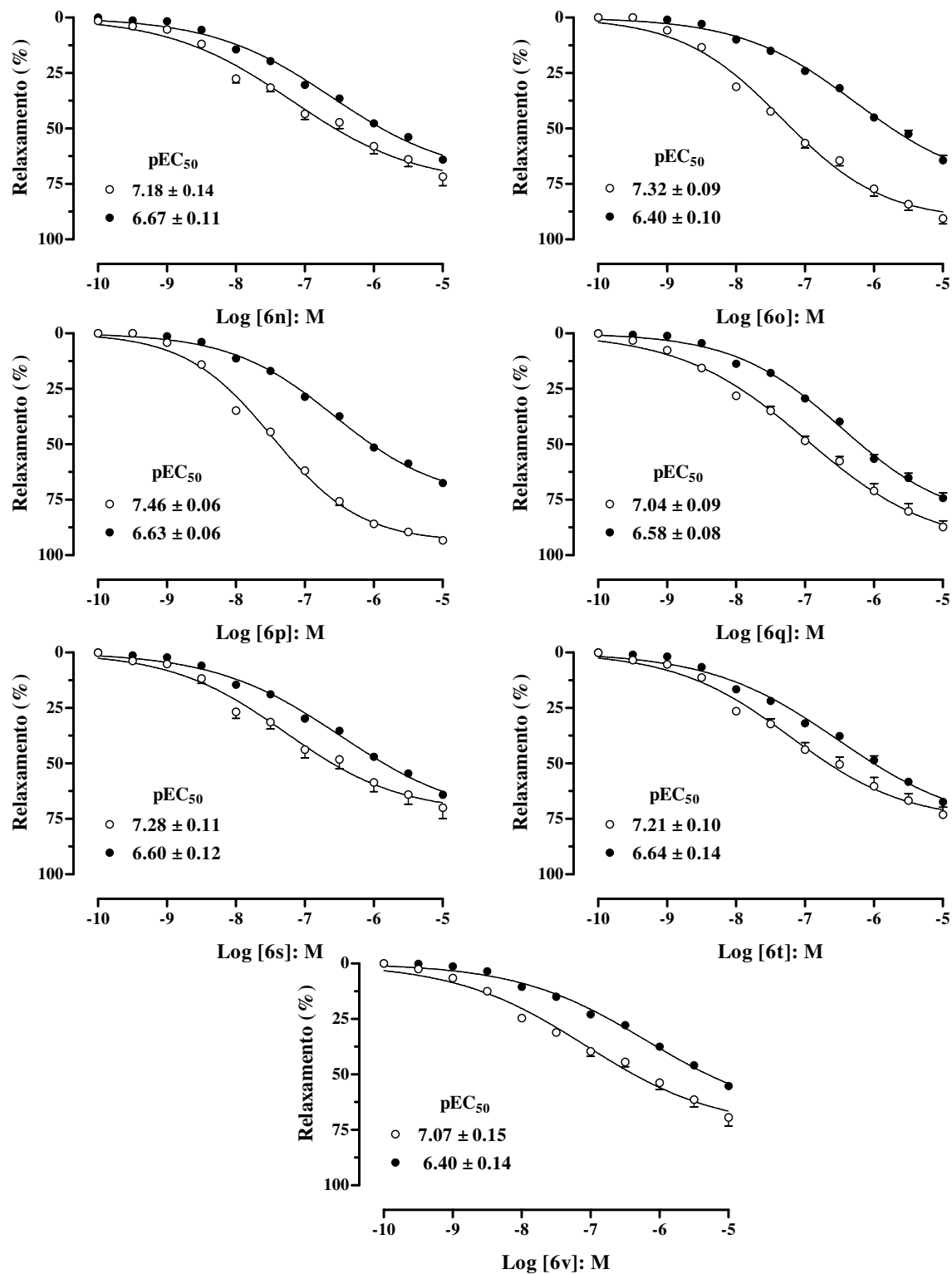


Figura I. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001–10 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (○) ou na presença (●) de ODQ (10 μM). Os dados representam as medias ± E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

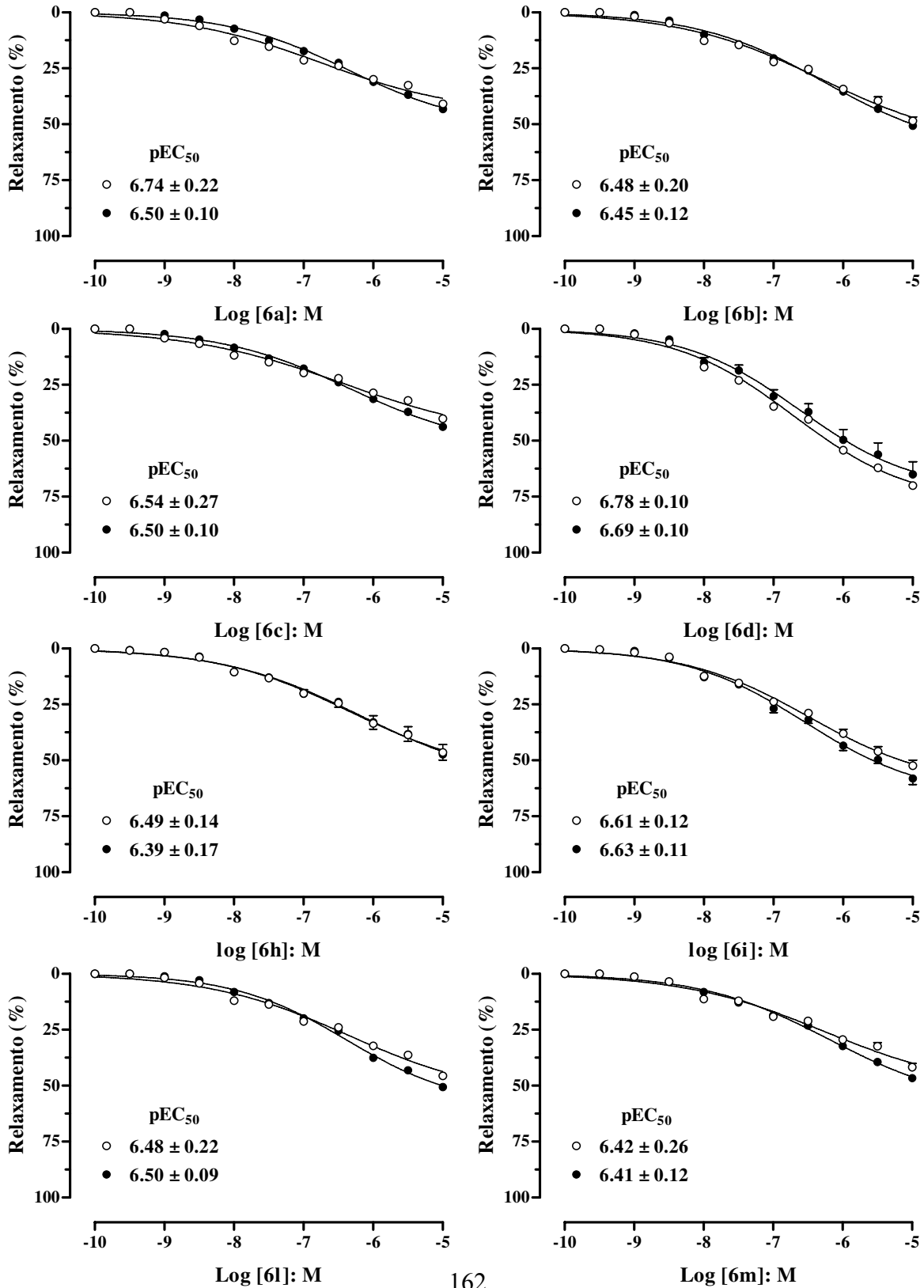
Apêndice J

Valores de potência (pEC_{50}) e de resposta máxima (E_{max}) do sildenafil e análogos (0,0001–10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na presença ou na ausência do ODQ (10 μ M). Dados representam a média \pm E.P.M para 6-8 experimentos.

	pEC_{50}		E_{max} (%)	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Sildenafil	6,57 \pm 0,11	6,51 \pm 0,09	56 \pm 1	54 \pm 2
6a	6,74 \pm 0,22	6,50 \pm 0,10	41 \pm 3	43 \pm 2
6b	6,48 \pm 0,20	6,45 \pm 0,12	49 \pm 4	51 \pm 3
6c	6,54 \pm 0,31	6,50 \pm 0,10	40 \pm 4	44 \pm 2
6d	6,78 \pm 0,10	6,69 \pm 0,10	70 \pm 3	65 \pm 6
6e	6,68 \pm 0,09	6,53 \pm 0,11	75 \pm 5	62 \pm 3
6f	6,71 \pm 0,10	6,55 \pm 0,11	67 \pm 4	61 \pm 4
6g	6,76 \pm 0,11	6,73 \pm 0,09	73 \pm 4	73 \pm 6
6h	6,49 \pm 0,14	6,39 \pm 0,17	47 \pm 4	47 \pm 4
6i	6,61 \pm 0,12	6,63 \pm 0,11	52 \pm 6	58 \pm 3
6l	6,48 \pm 0,22	6,50 \pm 0,09	46 \pm 4	51 \pm 2
6m	6,42 \pm 0,26	6,41 \pm 0,12	42 \pm 2	47 \pm 3
6n	6,69 \pm 0,11	6,64 \pm 0,14	61 \pm 4	59 \pm 4
6o	6,64 \pm 0,10	6,32 \pm 0,10	60 \pm 4	65 \pm 6
6p	6,68 \pm 0,10	6,75 \pm 0,08	72 \pm 6	68 \pm 7
6q	6,54 \pm 0,07	6,59 \pm 0,07	88 \pm 3	82 \pm 7
6r	7,01 \pm 0,11	7,14 \pm 0,07	82 \pm 3	86 \pm 2
6s	6,75 \pm 0,11	6,76 \pm 0,14	66 \pm 7	65 \pm 3
6t	6,73 \pm 0,11	6,66 \pm 0,13	69 \pm 5	60 \pm 5
6u	6,81 \pm 0,09	6,60 \pm 0,12	68 \pm 7	64 \pm 7
6v	6,47 \pm 0,19	6,34 \pm 0,14	51 \pm 5	53 \pm 4

Apêndice K

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do ODQ (10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido.



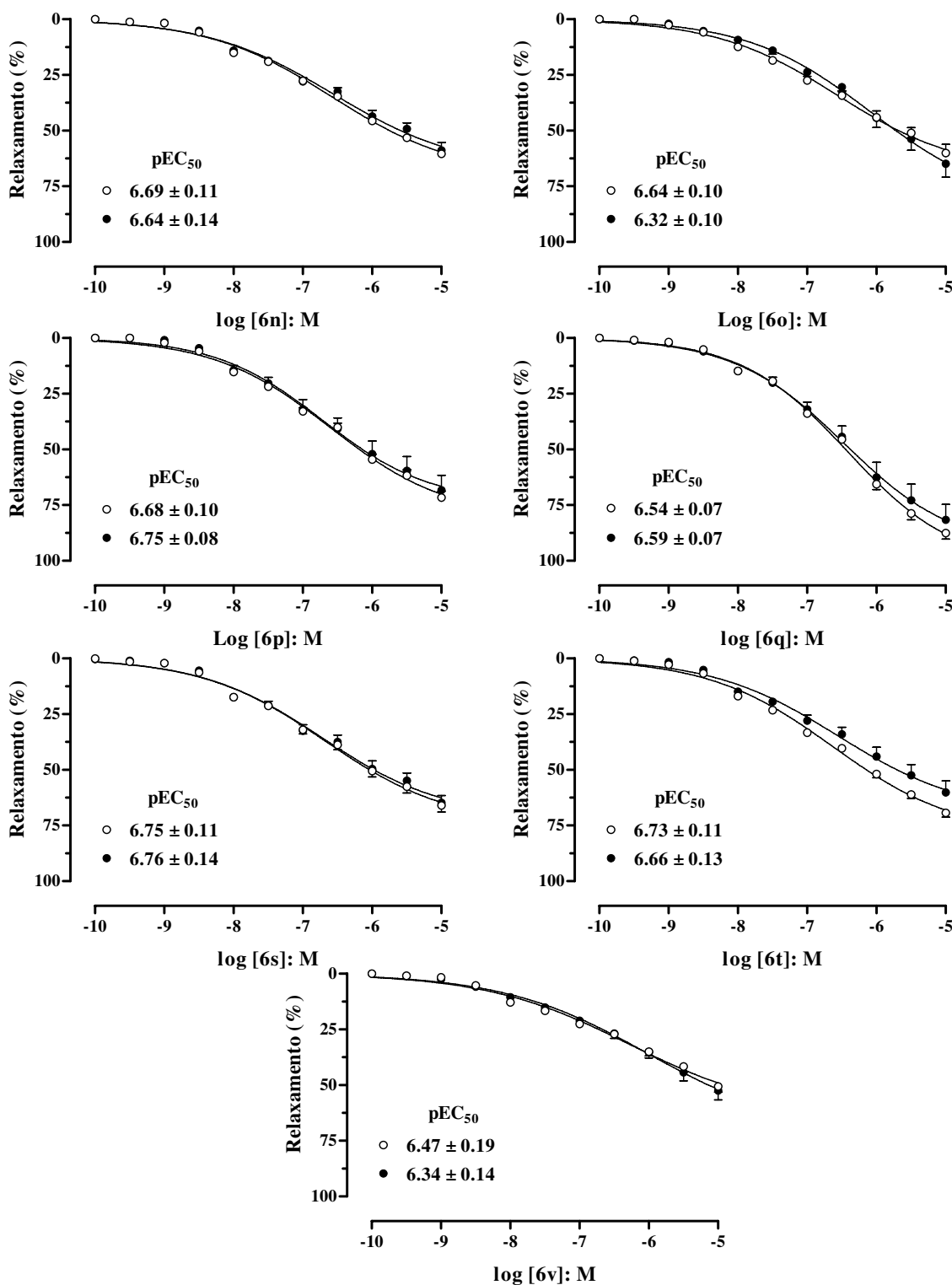


Figura K. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μM) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (o) ou na presença (●) de ODQ (10 μM). Os dados representam as medias ± E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

Apêndice L

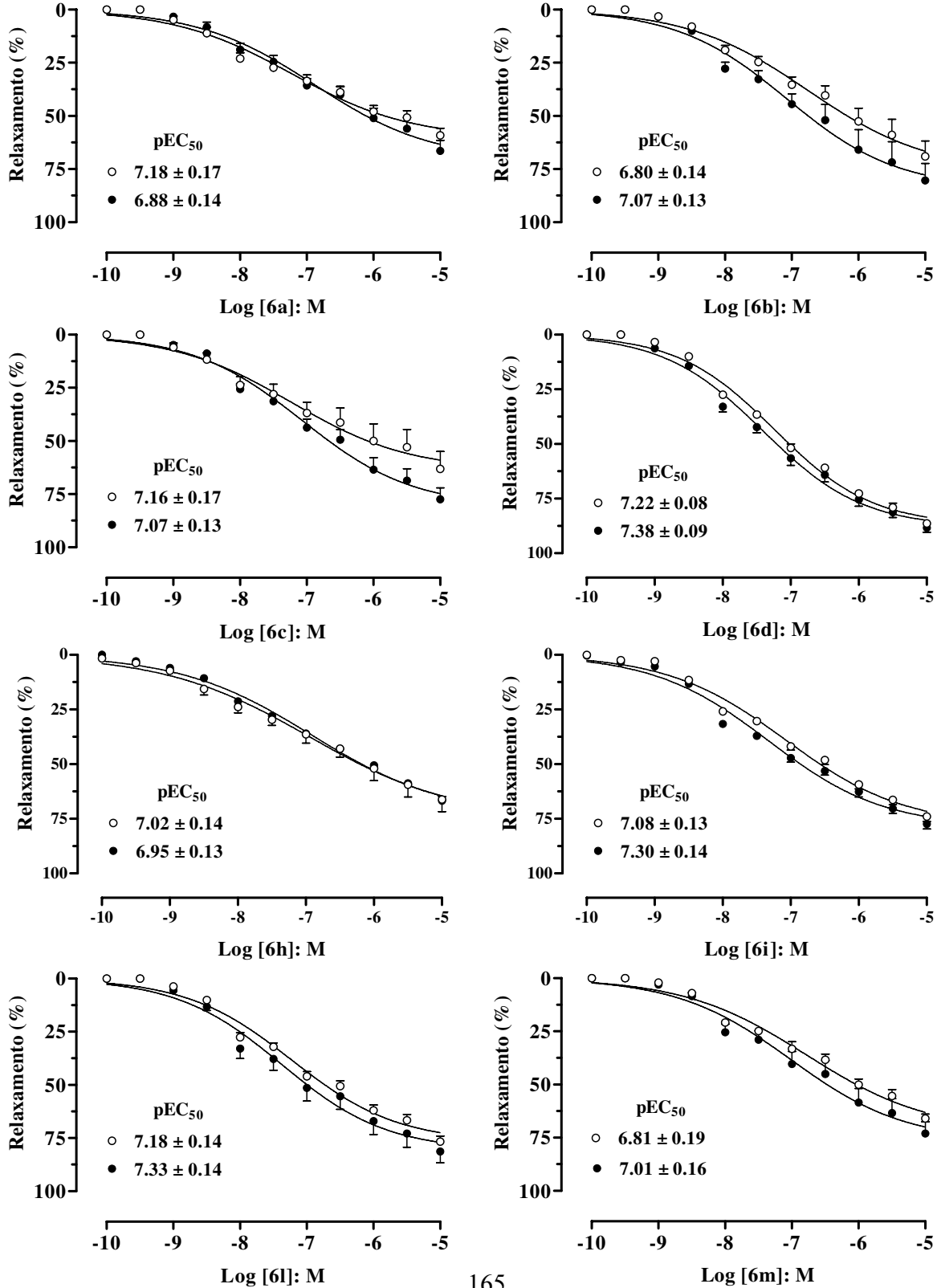
Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio íntegro, na presença ou na ausência do BAY 41-2272 (0,03 µM).

	pEC ₅₀		Shift†	E _{max} (%)	
	Ausência	Presença		Ausência	Presença
Sildenafil	7,25 ± 0,07	7,24 ± 0,08	-	76 ± 8	83 ± 7
6a	7,18 ± 0,17	6,88 ± 0,14	-	59 ± 3	67 ± 5
6b	6,80 ± 0,14	7,07 ± 0,13	-	69 ± 7	80 ± 8
6c	7,16 ± 0,17	7,07 ± 0,13	-	63 ± 8	77 ± 5
6d	7,22 ± 0,08	7,38 ± 0,09	-	86 ± 1	88 ± 2
6e	7,28 ± 0,10	7,45 ± 0,09	-	90 ± 4	95 ± 4
6f	7,28 ± 0,10	7,73 ± 0,08 [#]	3	89 ± 3	101 ± 1
6g	7,40 ± 0,06	7,64 ± 0,07	-	91 ± 4	97 ± 4
6h	7,02 ± 0,14	6,95 ± 0,13	-	66 ± 6	67 ± 2
6i	7,08 ± 0,13	7,30 ± 0,14	-	74 ± 6	77 ± 5
6l	7,18 ± 0,14	7,33 ± 0,14	-	77 ± 3	81 ± 5
6m	6,81 ± 0,19	7,01 ± 0,16	-	66 ± 2	73 ± 6
6n	7,18 ± 0,14	7,33 ± 0,11	-	72 ± 4	76 ± 7
6o	7,32 ± 0,09	7,47 ± 0,08	-	91 ± 5	102 ± 3
6p	7,46 ± 0,06	7,62 ± 0,07	-	93 ± 2	100 ± 3
6q	7,04 ± 0,09	7,35 ± 0,06 [*]	2	87 ± 3	99 ± 1
6r	7,21 ± 0,10	7,60 ± 0,07 [*]	2	82 ± 4	97 ± 2
6s	7,28 ± 0,11	7,38 ± 0,08	-	70 ± 5	83 ± 6
6t	7,21 ± 0,10	7,31 ± 0,11	-	73 ± 2	85 ± 7
6u	6,93 ± 0,12	7,41 ± 0,09 [*]	3	75 ± 5	88 ± 6
6v	7,07 ± 0,15	7,08 ± 0,10	-	69 ± 8	84 ± 3

†shift provocado pelo BAY 41-2272. * P<0,05, comparado com seu valor controle. #P<0,05, comparado ao valor do sildenafil na presença do BAY 41-2272. Dados representam a média ± E.P.M para 6-8 experimentos.

Apêndice M

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do BAY 41-2272 (0,03 μM) em anéis de aorta com endotélio íntegro.



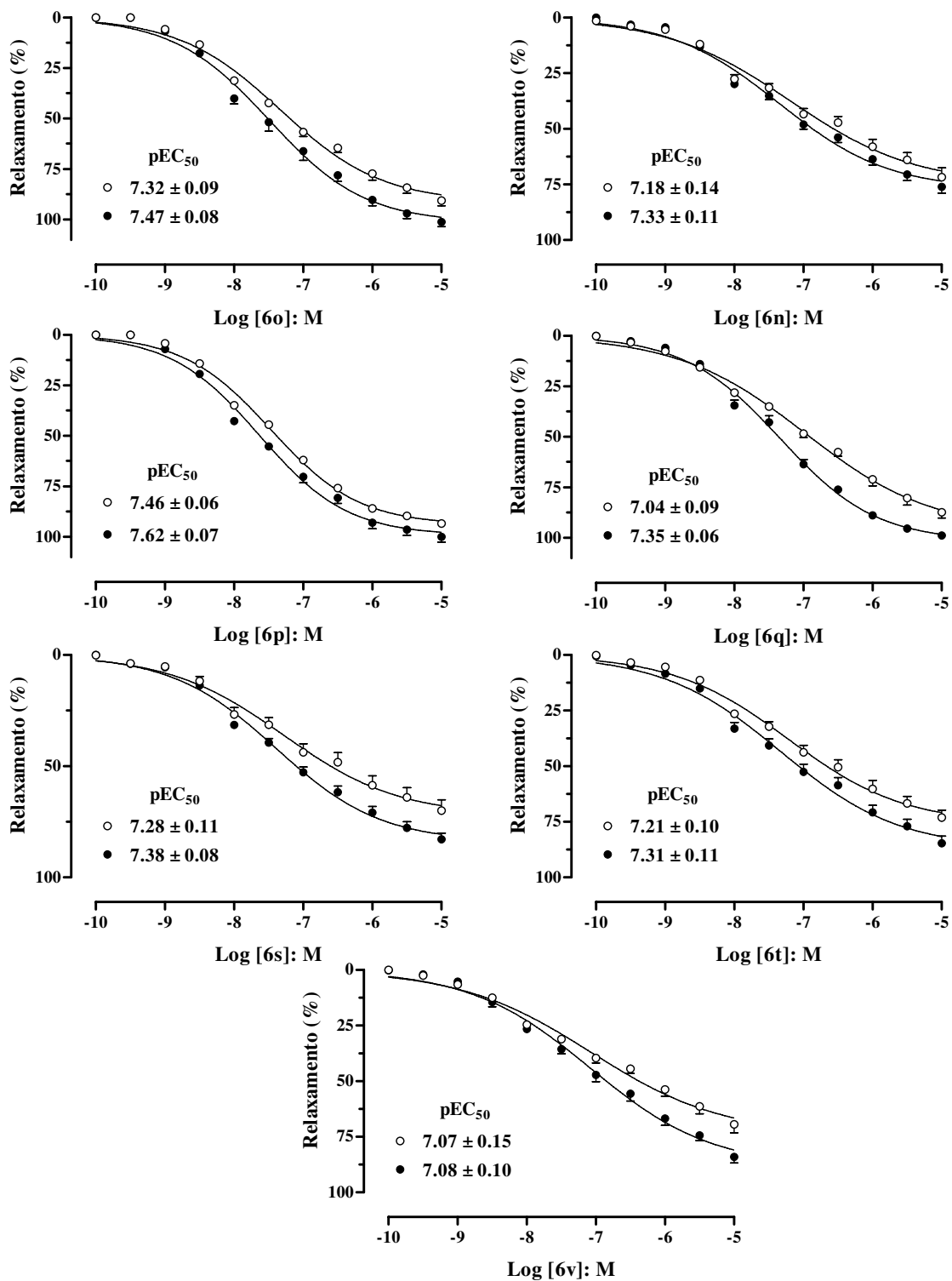


Figura M. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio íntegro, na ausência (o) ou na presença (●) de BAY 41-2272 (0,03 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

Apêndice N

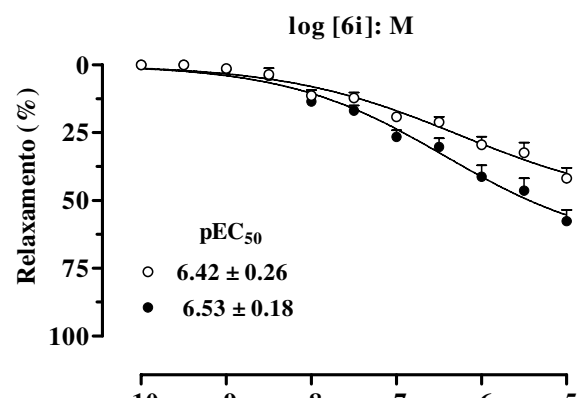
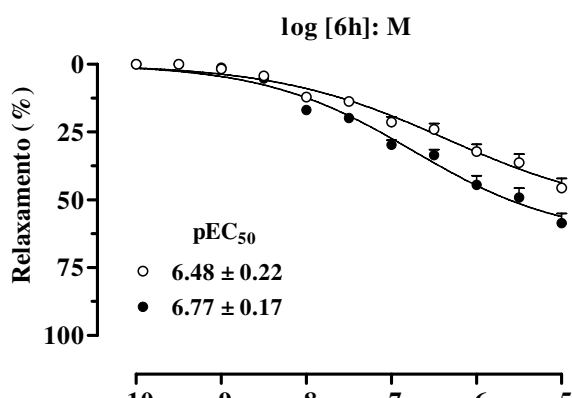
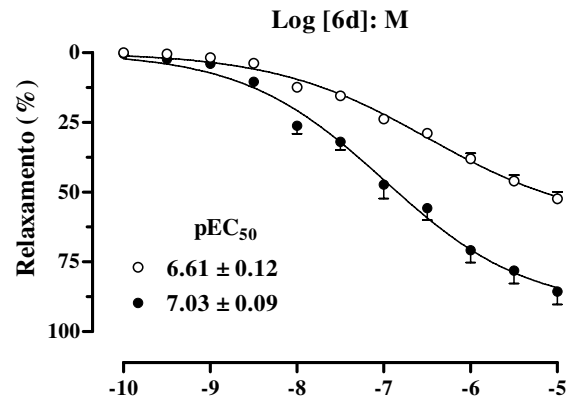
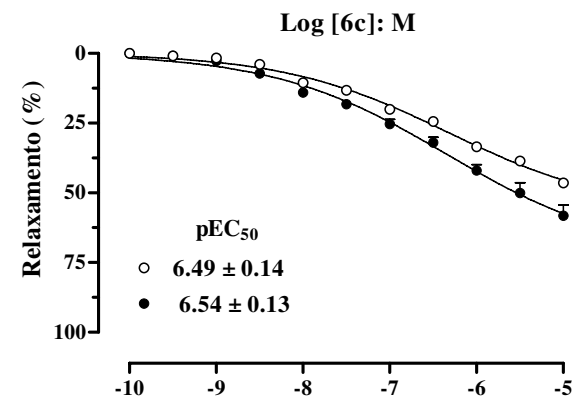
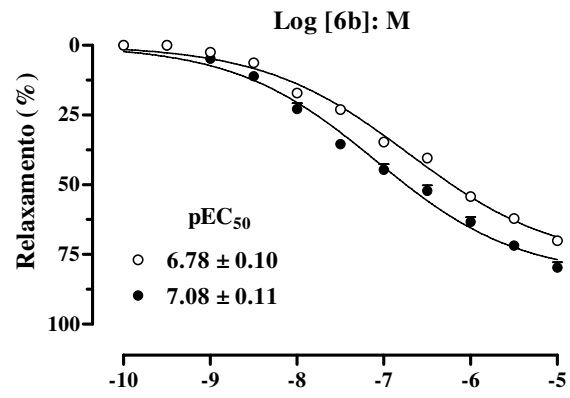
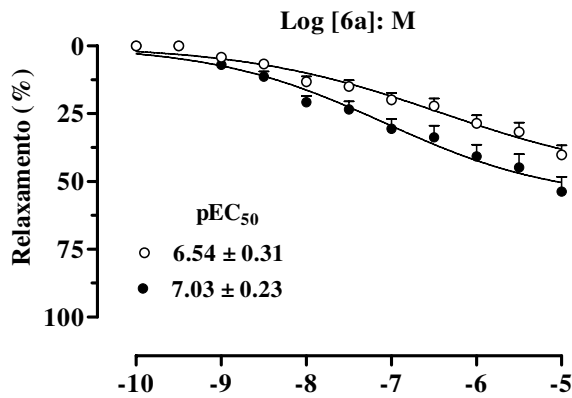
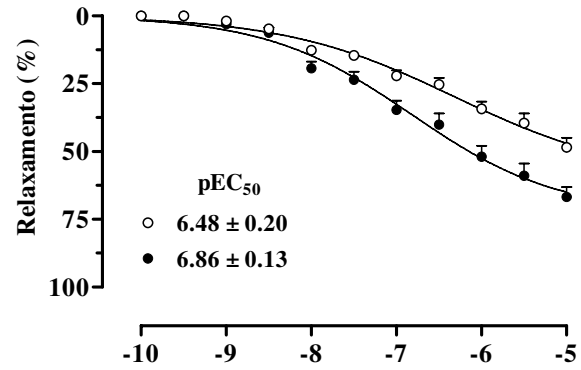
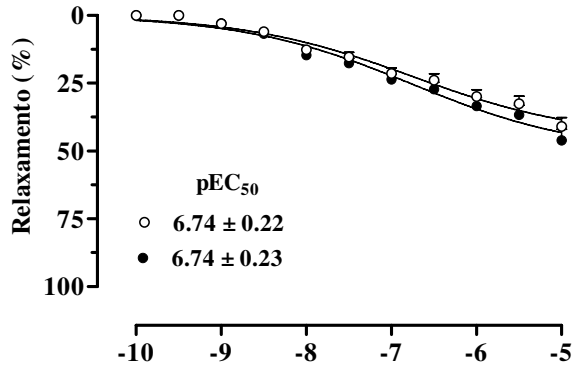
Valores de potência (pEC₅₀) e de resposta máxima (E_{max}) para o sildenafil e análogos em anéis de aorta com endotélio removido, na presença ou na ausência do BAY 41-2272 (0,03 μM).

	pEC ₅₀		Shift†	E _{max} (%)	
	Ausência	Presença		Ausência	Presença
Sildenafil	6,57 ± 0,11	6,85 ± 0,09	-	56 ± 1	66 ± 6
6a	6,74 ± 0,22	6,74 ± 0,23	-	41 ± 3	46 ± 4
6b	6,48 ± 0,20	6,86 ± 0,13	-	49 ± 4	67 ± 4
6c	6,54 ± 0,31	7,03 ± 0,23	-	40 ± 4	54 ± 5
6d	6,78 ± 0,10	7,08 ± 0,11 *	2	70 ± 3	80 ± 2
6e	6,68 ± 0,09	7,22 ± 0,08 **	3	75 ± 5	96 ± 2 *
6f	6,71 ± 0,10	7,23 ± 0,07 **	3	67 ± 4	94 ± 1 **
6g	6,76 ± 0,11	7,37 ± 0,07 **	4	73 ± 4	93 ± 5 *
6h	6,49 ± 0,14	6,54 ± 0,13	-	47 ± 4	58 ± 4
6i	6,61 ± 0,12	7,03 ± 0,09 *	3	52 ± 6	86 ± 5 *
6l	6,48 ± 0,22	6,77 ± 0,17	-	46 ± 4	59 ± 4
6m	6,42 ± 0,26	6,53 ± 0,18	-	42 ± 2	58 ± 4
6n	6,69 ± 0,11	7,09 ± 0,11 *	3	61 ± 4	79 ± 5 *
6o	6,64 ± 0,10	7,09 ± 0,06 *	3	60 ± 4	90 ± 3 *
6p	6,68 ± 0,10	7,04 ± 0,07 *	2	72 ± 6	88 ± 6
6q	6,54 ± 0,07	7,18 ± 0,05 **	4	88 ± 3	101 ± 2 *
6r	7,01 ± 0,11	7,50 ± 0,07 **	3	82 ± 3	98 ± 2 *
6s	6,75 ± 0,11	7,14 ± 0,09	-	66 ± 7	79 ± 3
6t	6,73 ± 0,11	6,90 ± 0,11	-	69 ± 5	81 ± 4
6u	6,81 ± 0,09	7,32 ± 0,06 **	3	68 ± 7	87 ± 8 *
6v	6,47 ± 0,19	6,51 ± 0,14	-	51 ± 5	55 ± 5

† *shift* à esquerda provocado pelo BAY 41-2272. *P<0,05; ** P<0,01, comparado com seu valor controle. # P<0,05, comparado com o valor do sildenafil na presença do BAY 41-2272. . Dados representam a média ± E.P.M para 6-8 experimentos.

Apêndice O

Relaxamento induzido pelos análogos do sildenafil na ausência e na presença do BAY 41-2272 (0,03 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido.



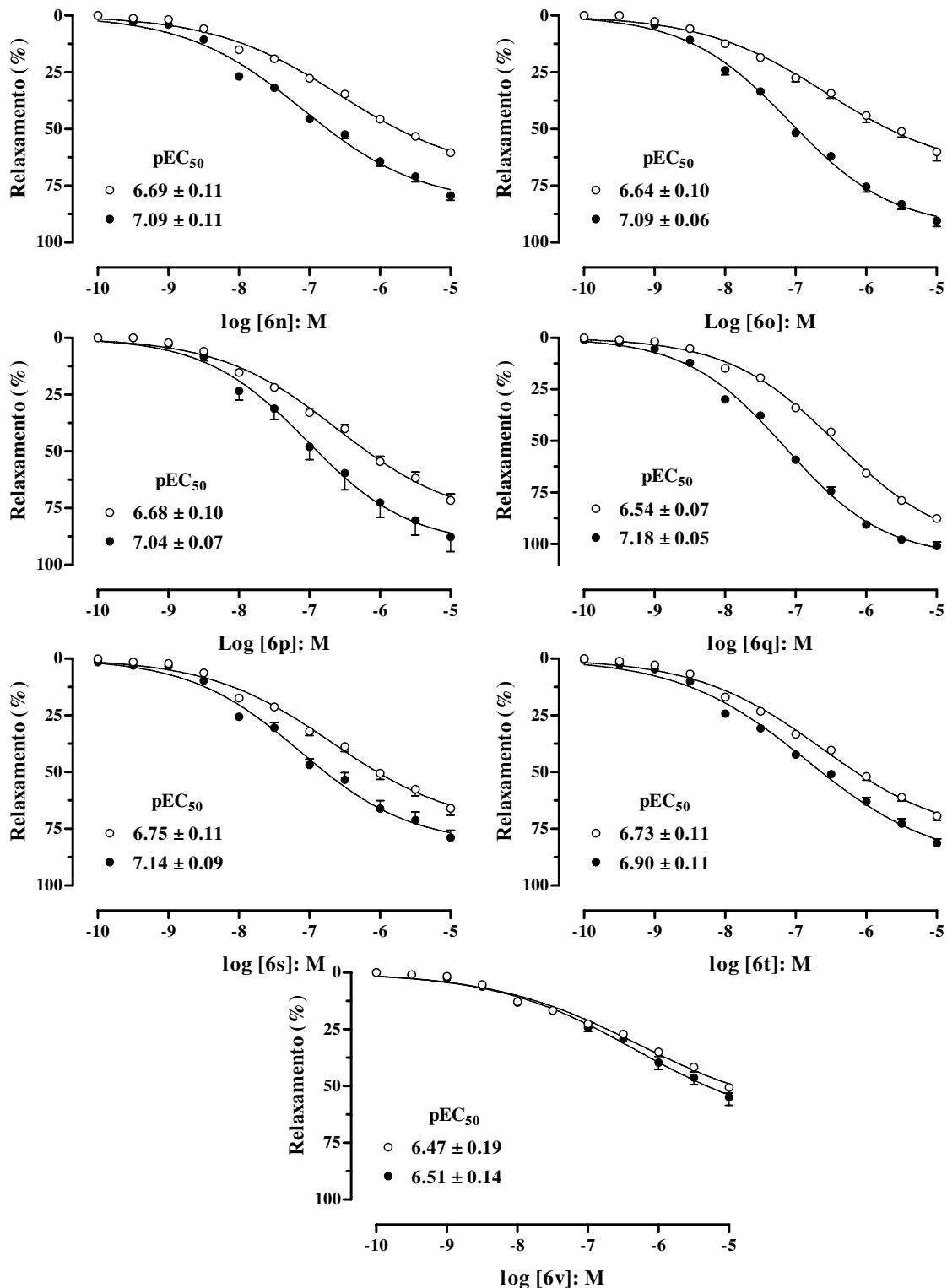
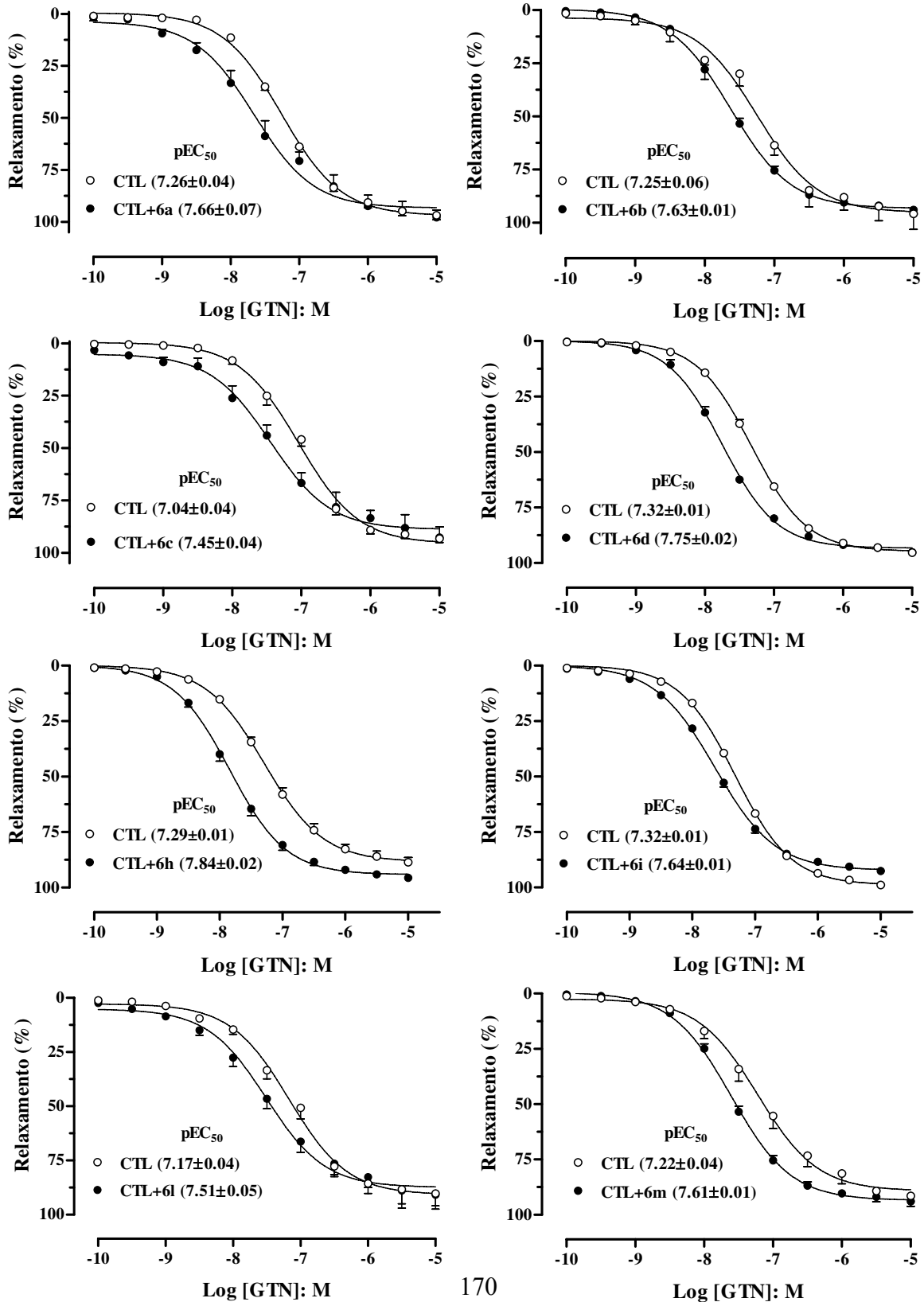


Figura O. Curva concentração-efeito ao sildenafil e aos análogos do sildenafil (0,0001-10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (o) ou na presença (●) de BAY 41-2272 (0,03 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.

Apêndice P

Relaxamento induzido pelo GTN na ausência e na presença dos análogos do sildenafil (6a-v, 0.1 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido.



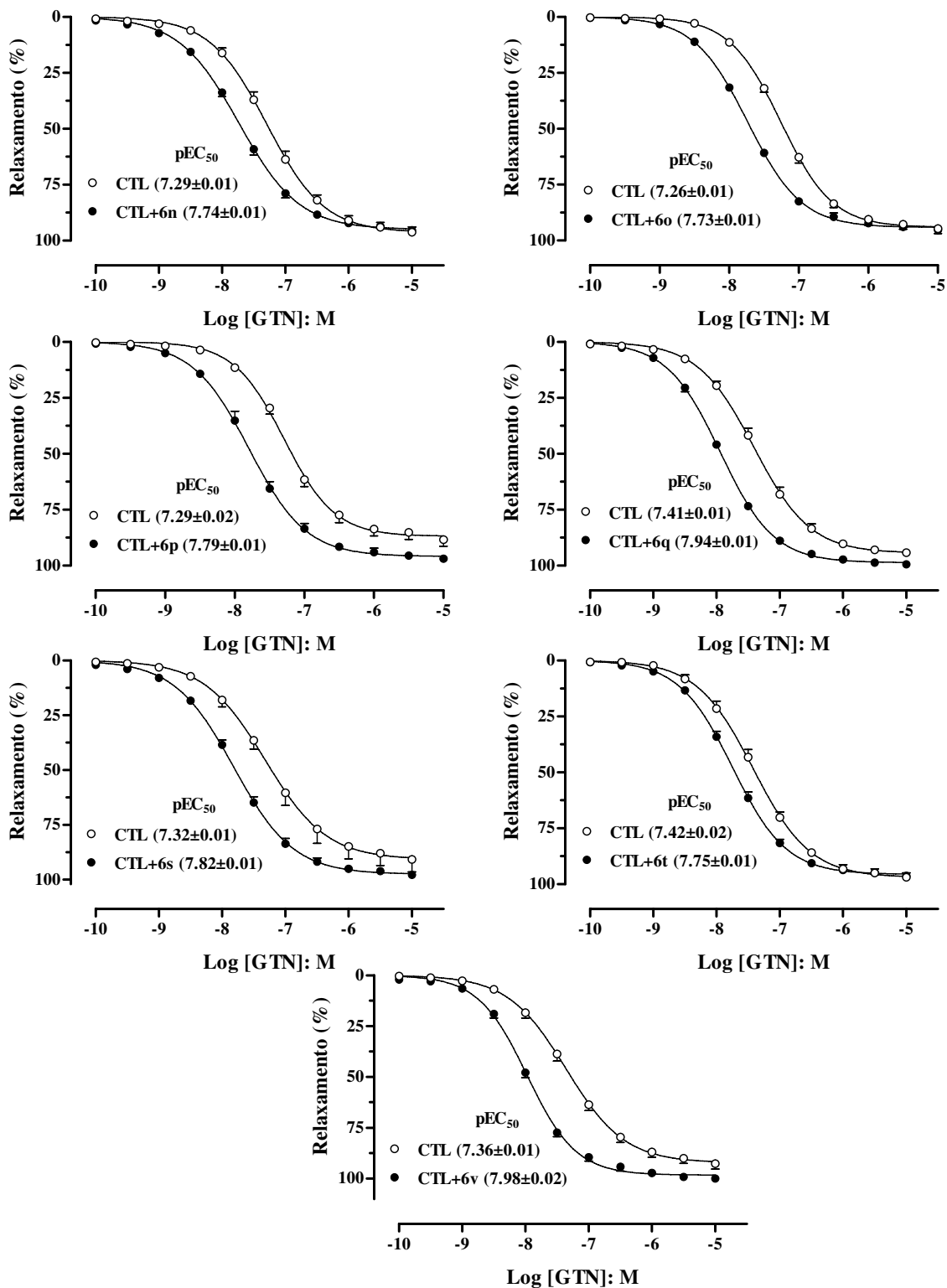


Figura P. Curva concentração-efeito ao GTN (0,0001–10 μ M) em anéis de aorta com endotélio removido, na ausência (o) ou na presença (●) dos análogos do sildenafil 6a-v (0,1 μ M). Os dados representam as medias \pm E.P.M. para 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos em cada painel.



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO


Certificamos que o Protocolo nº 993-1, sobre "ESTUDOS FUNCIONAIS E RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE 20 ANÁLOGOS DO SILDENAFIL EM AORTA ISOLADA DE COELHO" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gilberto De Nucci / Haroldo Alfredo Flores Toque está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

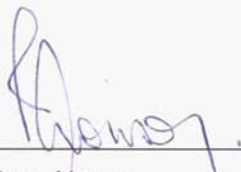
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 993-1, entitled "FUNCTIONAL STUDIES AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATION OF SILDENAFIL ANALOGUES IN THE RABBIT ISOLATED AORTA", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.

Campinas, 24 de junho de 2008.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva