

---

## **Inhibición selectiva de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en el diseño de fármacos vasodilatadores**

### ***Selective inhibition of phosphodiesterases of cyclical nucleotides in the design of vasodilator medicines***

**J. Mercapide, J.J. Martínez, E. Alberdi, E. Santiago**

---

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en el mundo occidental. Muchas de estas enfermedades tienen un componente vasoconstrictor común, lo que ha suscitado un gran interés por los mecanismos bioquímicos implicados en la contracción y relajación del músculo liso vascular. En los últimos años se ha puesto de relieve la importancia del óxido nítrico (NO) en la relajación del músculo liso vascular, abriendo nuevas posibilidades a la terapia de este tipo de enfermedades.

La nitroglicerina y otros nitratos orgánicos son potentes vasodilatadores comúnmente utilizados en el tratamiento de la angina de pecho, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardiaca congestiva<sup>1</sup>. La actividad vasorrelajante de estos compuestos está mediada por el óxido nítrico, que aumenta la concentración intracelular de GMPc activando a la guanilato ciclasa soluble. A su vez el GMPc es degradado activamente por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. La utilidad

terapéutica de los nitrovasodilatadores está severamente limitada por la rápida aparición de tolerancia, algunas veces en menos de 48 horas tras la exposición continuada a la nitroglicerina<sup>2</sup>. La tolerancia a la nitroglicerina no es total y no provoca necesariamente tolerancia cruzada con otros nitrovasodilatadores, lo que sugiere que la vía de vasorrelajación a través de GMPc permanece intacta<sup>3</sup>. Si se consiguiera elevar la concentración intracelular de GMPc mediante vías alternativas se podría revertir la tolerancia a los nitrocompuestos y reducir los efectos secundarios del tratamiento.

La inhibición de la hidrólisis de GMPc con inhibidores selectivos de fosfodiesterasas que degradan el GMPc podría ser una vía eficaz para potenciar el efecto vasorrelajante de los derivados nitro. Las fosfodiesterasas están presentes en todos los tejidos animales y regulan las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc, catalizando su hidrólisis a los respectivos nucleótidos 5'-monofosfato. El tipo y pro-

---

*ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 67-74.*

Departamento de Bioquímica. Universidad de Navarra.

#### **Correspondencia:**

J. Mercapide  
Departamento de Bioquímica  
Universidad de Navarra  
31080 Pamplona

porción de fosfodiesterasas varía considerablemente en diferentes tejidos, lo que está incentivando el desarrollo de inhibidores cada vez más selectivos con vistas a su posible uso terapéutico. El objetivo de este proyecto ha sido estudiar la acción de inhibidores selectivos de fosfodiesterasa como posibles fármacos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. La experiencia clínica con inhibidores de fosfodiesterasa demuestra que la selectividad es un factor fundamental a la hora de evitar los efectos secundarios del tratamiento. Parece lógico que la presencia de distintas isoenzimas en el mismo tejido responda a la existencia de diferentes modos de regulación, por lo que el bloqueo específico de la vía de interés evitaría otros efectos colaterales no deseados. Hemos analizado si la combinación de agentes donadores de óxido nítrico, como el nitroprusiato sódico (NPS), con inhibidores selectivos y no selectivos de fosfodiesterasas potencia el efecto de los primeros. Para ello aislamos las fosfodiesterasas presentes en músculo liso de aorta. Después determinamos la selectividad que cada inhibidor sobre las distintas fosfodiesterasas de músculo liso vascular. Por último, analizamos el papel que las distintas fosfodiesterasas de GMPc tienen en la regulación de la concentración de GMPc en células normales y tolerantes al nitroprusiato. Además se pretende determinar si la combinación de inhibidores de fosfodiesterasa con derivados nitro, tiene un efecto sinérgico en el aumento de la concentración de GMPc, y determinar cuáles son las fosfodiesterasas implicadas en el proceso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Separación de fosfodiesterasas de músculo liso de aorta porcina

Tras extraer la aorta se eliminó mecánicamente la grasa envolvente, la túnica adventicia y el endotelio, se cortó la túnica media en pequeños fragmentos y se añadieron a 100 ml de tampón de extracción (Tris/HCl 20 mM (pH 7,4), CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, acetato de magnesio 2 mM, DTT 1 mM) que contenía los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina 10 mg/l, benzamidina 10 mM, bestatina 10 mg/l, PMSF 1 mM, peps-

tatina 10 mg/l y leupeptina 10 mg/l. La muestra se homogeneizó en frío en un Polytron a 19.000 r.p.m. y el homogenado se centrifugó durante 50 min a 4 °C y 15.000 g. Las fosfodiesterasas se aislaron mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando como matriz Sepharose CL-6B (Pharmacia). La columna (1,6 × 17 cm) se equilibró con tampón de extracción y tras cargar la muestra se volvió a lavar con 7-8 volúmenes del mismo tampón. La elución se realizó lavando la columna con un gradiente lineal de NaCl 0,15 - 0,5 M disuelto en el mismo tampón (200 ml) y se recogieron 44 fracciones de 4,5 ml en tubos que contenían 100 µl de EGTA 35 mM. La medida de la actividad fosfodiesterasa ha sido descrita previamente<sup>1</sup>.

### Obtención de cultivos primarios de células de músculo liso vascular

Los cultivos se obtuvieron a partir de aortas de cerdo libres de grasa y tejido adherente cortadas en piezas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Se incubaron 1 ó 2 piezas de tejido a 37 °C durante 10 min, en un medio de digestión que contenía 200 U/ml de colagenasa tipo III, 15 U/ml de elastasa tipo I y 0,5 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja en DMEM. Tras la digestión se eliminó la túnica adventicia y el endotelio con el conjuntivo subyacente. La capa de músculo liso central se cortó en piezas de 1-2 mm de lado y se colocaron de 10 a 15 de éstas en cada frasco de cultivo en medio DMEM complementado con antibióticos y antimicóticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y fungizona 0,25 µg/ml), y suero bovino fetal al 20%. Al cabo de 7-10 días, una vez que las células en el frasco de cultivo alcanzan el 20-30 % de confluencia, se quitaron los explantes y se redujo la concentración de suero bovino fetal al 5 %. Los subcultivos siempre se realizaron a partir de células totalmente confluentes, mediante dos lavados consecutivos con HBSS e incubación con tripsina-EDTA durante 3 min a 37 °C. Después de inhibir la tripsina con suero, las células se centrifugaron a 900 r.p.m. y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio de cultivo. Los experimentos se realizaron sobre células confluentes con menos de 4 subcultivos.

### Medida de nucleótidos cíclicos

Se determinó el contenido de GMPc en células de músculo vascular extraídas de aorta de cerdo y cultivadas en placas de 12 pocillos. Después de tripsinizar y centrifugar células procedentes de frascos de cultivo, las células se transfirieron a placas, donde permanecieron 3-4 días antes de realizar los tratamientos. Antes de comenzar los tratamientos el medio de cultivo se sustituyó por medios definidos tamponados sin suero (PBS). Cuando el tratamiento incluía inhibidores de PDE, éstos se añadieron a cada pocillo media hora antes de estimular la síntesis de cGMP con NPS o factor natriurético atrial (FNA) y las placas de cultivo se incubaron a 37 °C durante los tiempos indicados. Al cabo de ese tiempo se detuvo la incubación retirando el medio y añadiendo a cada pocillo etanol al 70 % frío. En la mayor parte de los experimentos se realizaron medidas tanto en el medio de incubación como en los extractos etanólicos. El GMPc se midió utilizando un sistema de radioinmunoensayo basado en la competencia por la unión a un anticuerpo específico entre el GMPc no marcado y una cantidad fija de GMPc marcado con <sup>125</sup>I (Amersham). Se eligió el protocolo de acetilación frente al de no acetilación por su mayor sensibilidad.

### RESULTADOS

#### Separación de fosfodiesterasas de músculo liso de aorta de cerdo

Las fosfodiesterasas presentes en el músculo liso vascular de aorta de cerdo,

se aislaron empleando una cromatografía de intercambio iónico en un tampón que contenía 0,1 mM de calcio. En estas condiciones se separaron 4 isoenzimas diferentes: un primer pico con actividad específica para GMPc (PDE V), seguido de otro en el que la hidrólisis de AMPc y GMPc se estimula en presencia de calcio/calmodulina (PDE I), un tercer pico que hidroliza preferentemente AMPc y se inhibe por GMPc (PDE III), y una actividad fosfodiesterasa específica de AMPc sensible a rolipram (PDE IV). En esta cromatografía se consiguió la separación de las isoenzimas responsables de la degradación de GMPc en este tejido (PDE I y PDE V). Las isoenzimas aisladas se caracterizaron, utilizando para ello ocho inhibidores de referencia: zaprinast, milrinona, nicardipina, IBMX, papaverina, RO 20-1724, rolipram y dipiridamol. También se midió el efecto del GMPc sobre la hidrólisis de AMPc 1 µM (Tabla 1). La potencia de los diferentes compuestos como inhibidores fue diferente de unas isoenzimas a otras. PDE V es muy sensible a la inhibición por zaprinast y dipiridamol, que son inhibidores selectivos de esta isoenzima, y menos sensible a los inhibidores no selectivos papaverina e IBMX. La hidrólisis de GMPc por PDE I se inhibe con nicardipina, un compuesto de la familia de las dihidropiridinas, con una IC<sub>50</sub> menor que la de los inhibidores no selectivos IBMX y papaverina. Zaprinast es un mal inhibidor de esta isoenzima (IC<sub>50</sub> = 47,1 mM) y la actividad sobre PDE I del resto de inhibidores fue incluso menor. La PDE III se inhibe potentemente con milri-

**Tabla 1.** Valores de IC<sub>50</sub> (µM) de los compuestos sobre las fosfodiesterasas identificadas en aorta porcina. Medias ± D.E. (n= 4).

Inhibidor	PDE			
	I	III	IV	V
Zaprinast	47,1 ± 4,6	47,2 ± 4,8*	100 ± 13	0,23 ± 0,05
Milrinona	115 ± 7	2,0 ± 0,1	13,4 ± 3,4	45,2 ± 8,6
Nicardipina	3,7 ± 0,3	13,1 ± 1,4	6,1 ± 1,0	56,3 ± 2,2*
IBMX	12,2 ± 0,9	7,2 ± 1,0	8,7 ± 2,2	4,4 ± 0,6
Papaverina	21,8 ± 3,9	0,69 ± 0,07	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,8
RO 20-1724	13,4 ± 3,6*	88,3 ± 11,7	5,9 ± 2,1	133 ± 3
Rolipram	18,1 ± 3,1*	48,3 ± 2,1*	0,77 ± 0,13	117 ± 25
Dipiridamol	34,0 ± 6,6*	56,9 ± 3,6	5,6 ± 0,6	0,33 ± 0,07
GMPc	n.d.	1,7 ± 0,2	54,9 ± 3,7*	n.d.

\* Porcentaje de inhibición a 250 µM. n.d. no determinado.

nona, papaverina y GMPc. Del resto de compuestos, sólo nicardipina e IBMX son efectivos sobre PDE III, a concentraciones por debajo de 50  $\mu$ M. Los inhibidores más potentes de PDE IV fueron papaverina y rolipram, siendo este último el más selectivo.

#### **Síntesis y egresión de GMPc en células de músculo liso vascular**

En primer lugar determinamos cómo varía en el tiempo la cantidad intracelular de GMPc tras estimular su síntesis con concentraciones crecientes de NPS. La respuesta de las células a la estimulación con NPS es inmediata, registrándose un máximo en la cantidad intracelular de GMPc dentro de los primeros 5 minutos, que sólo desciende a valores basales (~ 150 fmol/millón de células) con las concentraciones de NPS más bajas (10 y 100 nM). Las concentraciones de GMPc intracelulares más elevadas se obtuvieron a los 2 minutos de tratamiento con nitroprusiato sódico, consiguiéndose aumentos máximos en torno a 20 veces la concentración basal, con NPS 10 y 100  $\mu$ M. Con las concentraciones de NPS más altas, la cantidad intracelular de GMPc no retornó a los valores basales tras una hora de incubación.

Un aspecto llamativo del metabolismo del GMPc es que una parte importante de este nucleótido es expulsado activamente al medio extracelular. Para conocer la importancia de la expulsión de GMPc en la regulación de la concentración intracelular de este nucleótido, determinamos la cinética de egresión del GMPc en células estimuladas con NPS, un activador de la guanilato ciclasa soluble, o con FNA, un activador de la guanilato ciclasa de membrana. Para ello se trataron los cultivos de células procedentes de músculo liso de aorta porcina con NPS 10  $\mu$ M o con FNA 0,5  $\mu$ M, y se midió la cantidad intra y extracelular de GMPc dentro de la primera hora de tratamiento. A pesar de que la concentración intracelular de GMPc alcanzada con NPS y FNA es similar, la cantidad de GMPc expulsada al medio extracelular es mucho menor con FNA que con NPS. En ambos casos la expulsión de GMPc es proporcional a su concentración intracelular, pero la velocidad de expulsión es 5 veces

menor cuando las células se estimulan con FNA en lugar de NPS. Las constantes de velocidad obtenidas fueron de 0,1  $\text{min}^{-1}$  para NPS y 0,02  $\text{min}^{-1}$  para FNA.

#### **Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas sobre la elevación de GMPc inducida con NPS o FNA**

Cuando se añaden inhibidores de fosfodiesterasa a células de músculo liso en cultivo la cantidad intracelular de GMPc no se ve afectada. Sólo los inhibidores no selectivos papaverina e IBMX a elevada concentración (100  $\mu$ M) elevan ligeramente (2-4 veces) la concentración basal de GMPc. Los inhibidores selectivos de la PDE V, zaprinast y dipiridamol, a una concentración a la que prácticamente inhiben por completo esta isoenzima en los ensayos de actividad enzimática, no alteran el contenido intracelular de GMPc. Tampoco la nicardipina, a una concentración a la que inhibe PDE I, tiene un efecto significativo.

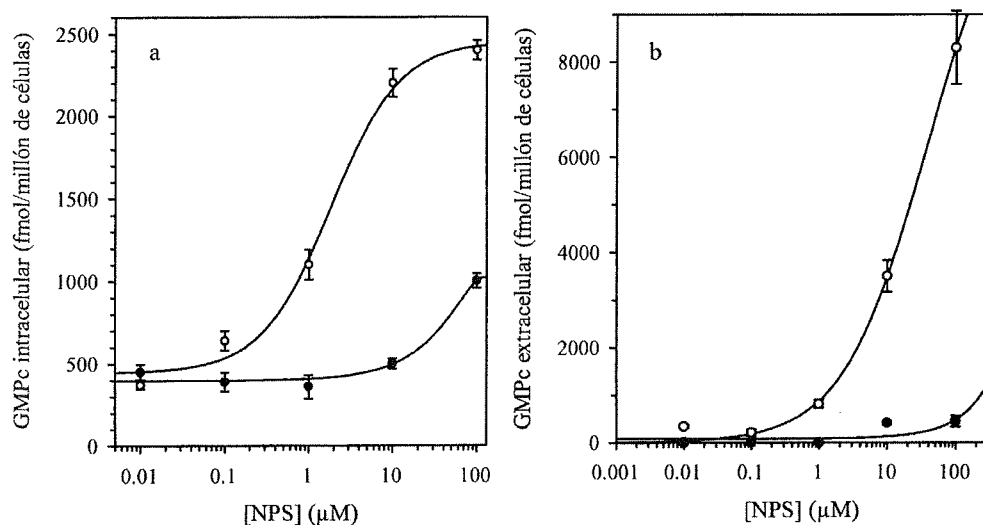
Uno de los objetivos principales de este trabajo era determinar si el tratamiento combinado con activadores de la guanilato ciclasa e inhibidores de fosfodiesterasa provoca un mayor aumento en la concentración de GMPc del que se obtiene únicamente con los primeros. Para probar esta hipótesis estudiamos el efecto combinado de un activador de la guanilato ciclasa soluble (NPS) o de membrana (FNA) con distintos inhibidores de fosfodiesterasa. En primer lugar medimos a lo largo del tiempo la cantidad de GMPc intra y extracelular cuando las células se tratan combinando FNA con zaprinast 10  $\mu$ M, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa que degrada selectivamente GMPc, o con IBMX 100  $\mu$ M, un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas. La cantidad intracelular de GMPc en el interior de las células tras estimular su síntesis con FNA, no resulta afectada por el pretratamiento con 10  $\mu$ M zaprinast, una concentración a la que este compuesto inhibe potente y selectivamente la PDE V. Con IBMX en cambio, sí se potencia la respuesta a FNA, lo que sugiere que las fosfodiesterasas hidrolizan rápidamente el GMPc sintetizado por la guanilato ciclasa de membrana estimulada con FNA.

Desde el punto de vista farmacológico resulta más interesante analizar el efecto de los inhibidores de fosfodiesterasa sobre la elevación de GMPc provocada por nitrovasodilatadores, que estimulan la guanilato ciclasa soluble. Se estudió el efecto de IBMX y zaprinast sobre el aumento de GMPc provocado por NPS. IBMX potencia el efecto del NPS de manera dependiente de la concentración empleada. Con IBMX 100  $\mu\text{M}$  se consiguió aumentar entre 5 y 10 veces, a lo largo de la primera hora de incubación, la cantidad intracelular de GMPc obtenida con NPS sólo. Este resultado indica que la actividad fosfodiesterasa de GMPc en las células es muy intensa. Zaprinast a 10  $\mu\text{M}$ , una concentración que inhibe selectivamente la PDE V, es incapaz de potenciar el efecto del NPS. Con 100  $\mu\text{M}$  zaprinast sí se potencia el efecto del NPS. Dado que zaprinast a 100  $\mu\text{M}$  es capaz de inhibir PDE V y PDE I en los ensayos de actividad (Tabla 1), estos resultados apoyan la hipótesis de que ambas isoenzimas participan activamente en la hidrólisis del GMPc en músculo liso vascular.

### Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas en células tolerantes al NPS

Se indujo tolerancia a NPS en células cultivadas de músculo liso vascular incubando las células durante una hora con 500  $\mu\text{M}$  de NPS. Posteriormente se hicieron 3 lavados sucesivos de los pocillos con PBS, renovando el tampón cada 10 minutos, y se iniciaron los tratamientos. La cantidad basal de GMPc en células tolerantes ( $110 \pm 24$  fmol/millón de células) es similar a la encontrada en células normales. Sin embargo, las células tolerantes responden al NPS con aumentos de GMPc sensiblemente menores que las células normales. De hecho, el desarrollo de tolerancia está asociado con una pérdida de sensibilidad al NPS de más de 100 veces (Fig. 1).

Diversos autores han descrito en estudios farmacológicos que el zaprinast es capaz de revertir, al menos parcialmente, la tolerancia a los nitrocompuestos. Para estudiar el mecanismo bioquímico que media esta reversión, estudiamos el efecto de zaprinast sobre la respuesta a NPS de células de músculo liso vascular que ha-



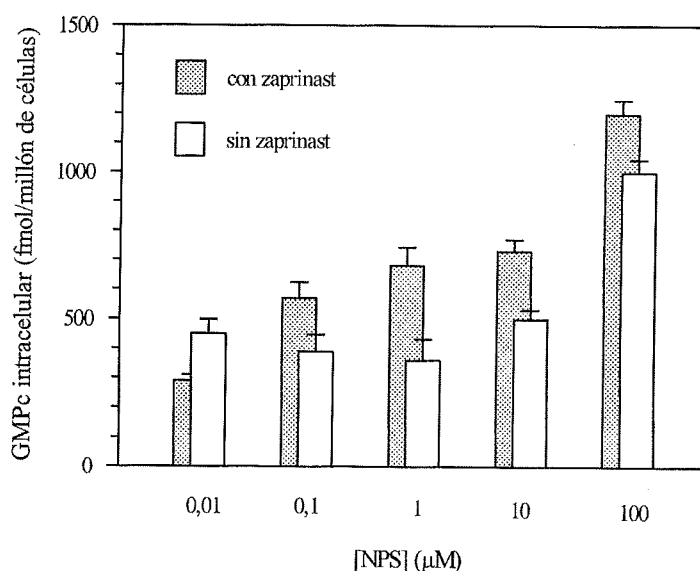
**Figura 1.** Efecto de NPS sobre la cantidad de GMPc intra y extracelular en células normales y tolerantes. Los gráficos muestran la cantidad de GMPc intracelular (a) y extracelular (b) medida a los 2 y 20 minutos respectivamente, tras la adición de varias concentraciones de NPS a células tolerantes ( $\bullet$ ) y no tolerantes ( $\circ$ ) al NPS.

bían desarrollado tolerancia al NPS. Para ello se indujo tolerancia a las células con NPS 500  $\mu\text{M}$ , y tras lavarlas repetidamente con PBS, se trataron durante media hora con zaprinast 10  $\mu\text{M}$ . Al cabo de ese tiempo, se estimuló la síntesis con NPS y se midió la cantidad intracelular de GMPc. Zaprinast potencia el efecto del nitroprusiato en células tolerantes a este compuesto (Fig. 2). De hecho, la cantidad de GMPc intracelular obtenida con 0,1  $\mu\text{M}$  de NPS en

células tolerantes pretratadas con zaprinast, son similares a las obtenidas en células no tolerantes. Esta potenciación se produce con todas las concentraciones de NPS probadas y contrasta con la ausencia de efecto de zaprinast en células no tolerantes.

## DISCUSIÓN

El cromatograma obtenido en el aislamiento de fosfodiesterasas de músculo



**Figura 2.** Potenciación del efecto de NPS en células tolerantes incubadas con zaprinast. Se determinó la cantidad de GMPc a los 2 minutos tras la estimulación con distintas concentraciones de NPS en células que habían sido incubadas previamente durante media hora con zaprinast 10  $\mu\text{M}$  o con tampón. Medias  $\pm$  D.E. de 2 pocillos de células en cada uno de los cuales se hicieron 2 medidas.

liso de aorta de cerdo sugiere que PDE I y PDE V contribuyen de modo cuantitativamente comparable a la hidrólisis total de GMPc. Obviamente esta estimación no es extrapolable a la célula, donde la actividad relativa de ambas isoenzimas es el resultado de la integración de diversos factores que pueden modular la actividad de estas isoenzimas in vivo. De hecho, la opinión más extendida es que PDE V es la enzima responsable de la degradación de GMPc intracelular en músculo liso vascular<sup>5-7</sup>. La principal prueba experimental parte de los estudios bioquímicos y far-

macológicos en rata y conejo con zaprinast, un inhibidor selectivo de la PDE V y, en menor medida, de estudios con otros inhibidores selectivos de esta enzima desarrollados recientemente<sup>5-7</sup>.

En contraste con estos trabajos, los resultados obtenidos muestran que en células de músculo liso vascular de aorta de cerdo, zaprinast a 10 mM no potencia el efecto de NPS ni de FNA, a pesar de que en esas condiciones la degradación del GMPc intracelular por fosfodiesterasas es muy elevada. Estos datos apoyan la hipótesis de que tanto PDE I como PDE V participan

activamente en la degradación de GMPc en este tejido y la inhibición de cualquiera de ellas es necesaria, pero no suficiente, para obtener un efecto sinérgico con los nitrovasodilatadores. Aunque se ha postulado una mayor implicación de PDE V que de PDE I en la hidrólisis del GMPc sintetizado por estimulación con nitrocompuestos en músculo vascular<sup>5,8,9</sup>, la ausencia de inhibidores adecuados de PDE I impide confirmar esta hipótesis.

Una limitación de su uso terapéutico de los nitrovasodilatadores es el desarrollo de tolerancia que habitualmente ocurre tras el uso repetido de estos fármacos. Aunque no se conoce el mecanismo exacto que provoca la tolerancia a los nitrovasodilatadores, se sabe que está asociado con una menor elevación del contenido de GMPc en las células del músculo liso vascular en respuesta a una posterior exposición al nitrovasodilatador<sup>10</sup>. Se ha propuesto que la tolerancia se desarrolla por agotamiento del poder reductor de los grupos tiol implicados en la formación de NO, por alteraciones en la actividad o en la expresión de la guanilato ciclasa soluble y/o por un aumento de la hidrólisis del GMPc catalizado por las fosfodiesterasas. Zaprinast a concentraciones selectivas hacia PDE V potencia la respuesta al NPS en células tolerantes, incluso con las concentraciones de NPS más bajas. El hecho de que la cantidad de GMPc extracelular en presencia de zaprinast sea muy inferior a la de células normales, indica que la reversión de la tolerancia por zaprinast es debida a inhibición de la actividad fosfodiesterasa de GMPc, y no a una recuperación de la síntesis de este nucleótido.

Nuestros resultados con células tolerantes al NPS son coherentes con los publicados por otros autores en estudios farmacológicos con arterias tolerantes a la nitroglicerina. Zaprinast aumenta la respuesta a la nitroglicerina y revierte, al menos parcialmente, la tolerancia a este compuesto en aorta de rata<sup>10,11</sup>, en arteria coronaria de cerdo<sup>12</sup> y en estudios *in vivo* con ratas<sup>3,11</sup>. El tratamiento con zaprinast, un inhibidor selectivo de PDE V, permite revertir en los modelos animales la tolerancia, lo que ha estimulado la investigación sobre la posible utilidad clínica de

estos inhibidores<sup>3,10</sup>. Los resultados obtenidos indican que la importancia relativa de PDE V respecto a PDE I es mayor en células tolerantes, y así, la inhibición selectiva de PDE V con zaprinast potencia la respuesta de las células al nitroprusiato. Esto sugiere que en el desarrollo de la tolerancia hacia los nitrovasodilatadores se produce, además de una disminución en la síntesis de GMPc, una regulación de la actividad relativa de ambas fosfodiesterasas de GMPc no descrita previamente. Sin embargo, zaprinast es incapaz de bloquear el desarrollo de tolerancia hacia los nitrovasodilatadores, de modo que el problema de fondo, la menor producción de GMPc por parte de las células tolerantes, persiste. De los resultados de este trabajo se deduce que en la hidrólisis de GMPc en células no tolerantes estimuladas con NPS, participan de modo significativo PDE I y PDE V y, consecuentemente, la inhibición selectiva de PDE V no aumenta el efecto de los nitrovasodilatadores. Puesto que la tolerancia es un fenómeno gradual y el grado de tolerancia alcanzado depende de la concentración de nitrovasodilatador empleada, una posibilidad terapéutica podría ser la combinación de una molécula con capacidad de inhibir tanto a PDE I como a PDE V con un nitrocompuesto. De este modo la potenciación del efecto del nitrovasodilatador permitiría usar una menor concentración del mismo, reduciendo así el riesgo de aparición de tolerancia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AHLNER J, ANDERSSON RGG, TORFGARD K, AXELSSON KL. Organic nitrates esters: clinical use and mechanisms of action. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 351.
2. HARRISON DG, BATES JN. The nitrovasodilators new ideas about old drugs. *Circulation* 1993; 87: 1461.
3. DE GARAVILLA L, PAGANI ED, BUCHHOLZ RA, DUNDORE R, BODE DC, VOLBERG ML et al. Zaprinast, but not dipyridamole, reverses hemodynamic tolerance to nitroglycerin *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 1996; 313: 89-96.
4. MONGE A, ALDANA I, LOSA MJ, FONT M, CASTIELLA E, FRECHILLA D et al. A novel class of cardiotonic agents: synthesis and biological evaluation of pyridazino[4,5-b] indoles with cyclic AMP phosphodiesterases inhibiting properties. *J Phar Sci* 1993; 82: 1-4.

5. SILVER PJ, DUNDORE RL, BODE DC, DE GARAVILLA L, BUCHHOLZ RA, VAN ALLER G *et al*. Cyclic GMP potentiation by WIN 58237, a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 1143-1149.
6. SAEKI T, ADACHI H, TAKASE Y, YOSHITAKE S, SOUDA S, SAITO I. A selective type V phosphodiesterase inhibitor, E4021, dilates porcine large coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 825-831.
7. COSTE H, GRONDIN P. Characterization of a novel potent and specific inhibitor of type V phosphodiesterase. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1577-1585.
8. AHN HS, CRIM W, ROMANO M, SYBERTZ E, PITTS B. Effects of selective inhibitors on cyclic nucleotide phosphodiesterases of rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 3331-3339.
9. MIYAHARA M, ITO M, ITOH H, SHIRAISHI T, ISAKA N, KONISHI T *et al*. Isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in the human aorta: characterization and the effects of E4021. *Eur J Pharmacol* 1995; 284: 25-33.
10. PAGANI ED, VAN ALLER GS, O'CONNOR B, SILVER PJ. Reversal of nitroglycerin tolerance in vitro by the cGMP-phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* 1993; 243: 141-147.
11. SILVER PJ, PAGANI ED, DE GARAVILLA L, VAN ALLER GS, VOLBERG ML, PRATT PF *et al*. Reversal of nitroglycerin tolerance by the cGMP phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* 1991; 199: 141-142.
12. MERKEL LA, RIVERA LM, PERRONE MH, LAPPE RW. In vitro and in vivo interactions of nitrovasodilators and zaprinast, a cGMP-selective phosphodiesterase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 1992; 216: 29-35.