RAQUEL LORENZETTI

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS POR HPLC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DE SILDENAFIL SOBRE FOSFODIESTERASE

CAMPINAS

Unicamp

2007

RAQUEL LORENZETTI

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS POR HPLC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DE SILDENAFIL SOBRE FOSFODIESTERASE

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: Gilberto de Nucci

CAMPINAS

Unicamp

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

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

L887m	Lorenzetti, Raquel Método de quantificação de nucleotídeos por HPLC-MS/MS e avaliação da atividade de análogos de sildenafil sobre fosfodiesterase. / Raquel Lorenzetti. Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientador: Gilberto de Nucci Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Inibidores de fosfodiesterase. 2. Nucleotídios. 3. Espectrometria de massas. 4. Óxido nítrico. 5. Nucleotídios cíclicos técnica. I. Nucci, Gilberto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Method of quantification of nucleotides by HPLC-MS/MS and evaluation of the activity of sildenafil analoges in phosphodiesterase

Keywords: . Phosphodiesterase inhibitor

. Nucleotides

. Mass spectrometry

. Nitric oxide

. Ciclic nucleotides technique

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Profº. Drº. Gilberto de Nucci

Profº. Drº. Stephen Hyslop

Profº. Drº. Eros Antonio de Almeida

Profª. Drª. Silvia Lacchini

Profº. Drº Dárcio Gomes Pereira

Data da defesa: 27-08-2007

UNICAMP

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Prof. Dr. Dárcio Gomes Pereira

Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Silvia Lacchini

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

Data: 28/08/2007

200806 2666

Ao ***Deus,***
pelos dons com os quais me presenteou,
pela família admirável que me deu,
onde pude me desenvolver como pessoa.

Aos meus pais,
Deoclides Lorenzetti *e* ***Maria Eugenia Lorenzetti****,*
pelo imenso amor,
pelo incentivo,
porque sempre acreditaram em mim.

Aos meus irmãos,
Claudia lorenzetti,
Deoclides lorenzetti Junior e
Christian Ricardo Lorenzetti*,*
meus amigos de sempre e
para sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Gilberto de Nucci**, pela orientação, e principalmente pela oportunidade de crescimento científico que me permitiu a realização deste trabalho e a conclusão deste Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Stephen Hyslop** pela amizade e pela disponibilidade da sua generosidade em momentos fundamentais deste trabalho.

Aos docentes **Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dr. Cleber E. Teixeira (in memorian), Dr. José Luiz Donato, Profa. Dra Sisi Marcondes, Profa. Dra. Elen C. T. Landucci, Profa. Dra Albetiza Lobo, Prof. Dr. Heitor Moreno**, Profa. Dra. Maricene Shaba, Prof. Dr. John pelo convívio, pelo auxílio e pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Às amizades que fiz nestes anos de trabalhos que Deus colocou em meu caminho. **Aline Maziero, Ana Cecília Montes, Cristina Okuyama, Juliana Baracat, Juliana Moreira, Letícia, Leyge Couto, Lourdes e Márcia Cardoso.**

Aos meus queridos amigos **Christina Santana,** Cristiane Aguiar, Fabiana Sponchiado, Vinicius e Sueli.

A todos os meus amigos da Unicamp, Galeno e Fundação André Tosello: Adriana, Alessandra, Aline Maria, Amanda, André, Andréia, Carla, Carol, César, Daniel, Deise, Eduardo, Enilton, Érika, Fabiana, Fabíola, Fernanda, Gláucia, Gustavo, Haroldo, Hugo, Humberto, Ivani, Jane, Josiane, Juliano, Lara, Leonardo, Letícia, Luis, Mariana, Mário, Mauro, Pámela, Paula, Priscila, Rafael, Renata, Riccardo, Sandro, Sara, Sérgio, Sílvia, Tatiane, Thomas e Wilma.

A todos os **funcionários do departamento de Farmacologia da Unicamp,** por todo respeito, carinho e dedicação com que sempre me receberam e por todo os momentos de ajuda indispensável.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (Fapesp), pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO..... xviii

ABSTRACT..... xx

1- INTRODUÇÃO..... 22

1.1- Fosfodiesterases..... 23

1.1.1- Classificação..... 24

1.1.2- Estrutura..... 25

1.1.3- Fosfodiesterase 5..... 26

1.2- Métodos de dosagem da atividade de fosfodiesterases..... 28

1.3- Disfunção erétil23..... 30

1.4- Sildenafil..... 31

1.4.1- Impacto econômico..... 34

1.5- Análogos de sildenafil..... 34

1.6- OBJETIVOS..... 37

1.6.1- Objetivo geral..... 37

1.6.2- Objetivos específicos..... 37

2- MATERIAL E MÉTODOS..... 38

2.1- Atividade de fosfodiesterases por método HPLC-MS/MS..... 39

2.1.1- Padronização..... 39

2.1.1.1- Protocolo experimental..... 39

2.1.1.2- Curva de calibração e limite de quantificação..... 40

2.2- Atividade inibitória da PDEs..... 40

2.2.1- Inibição da fosfodiesterase 5 *in vitro*..... 40

2.2.1.1- Procedimento experimental..... 40

2.2.2- Agregação plaquetária..... 41

2.2.2.1- Procedimento experimental..... 41

2.3- Estudo de estabilidade dos inibidores de PDEs..... 42

2.3.1- Estabilidade em meio ácido..... 42

2.3.2- Estabilidade em plasma humano..... 43

2.3.3- Condições cromatográficas..... 43

2.4- Metabolização *in vitro*..... 45

2.4.1- Estudo com microssomas de rato..... 45

2.4.2- Estudo com hepatócitos de rato..... 45

2.5- Avaliação farmacocinética..... 46

2.5.1- Animais..... 46

2.5.2- Procedimento experimental..... 46

2.5.3- Condições cromatográficas e espectrometria de massa..... 47

2.5.4- Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos..... 48

2.6- Análise estatística..... 48

3- RESULTADOS..... 49

3.1- Resultados da padronização do método..... 50

3.2- Atividade inibitória..... 57

3.2.1- Inibição de PDE5 *in vitro*..... 57

3.2.2- Agregação plaquetária..... 59

3.3- Estudo de estabilidade..... 61

3.3.1- Estabilidade em meio ácido..... 61

3.3.2- Estabilidade em plasma humano..... 62

3.4- Metabolismo *in vitro* 63

3.4.1- Microssomas 63

3.4.2- Hepatócitos 64

3.5- Avaliação Farmacocinética 67

3.5.1- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil, i.v. 67

3.5.2- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do análogo carbonato, i.v. 68

3.5.3- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do análogo uretana, i.v. 70

3.5.4- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil, v.o. 71

3.5.5- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos análogo carbonato, v.o. 73

4- DISCUSSÃO 75

5- CONCLUSÃO 82

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

μ	micro
AC	adenilato ciclase
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ASC_{0-24h}	área sob a curva
C_0	concentração plasmática inicial
CAD	dissociação ativada por colisão
CE	energia de colisão
CGRP	gene da calcitonina
Cl	*clearance* ou depuração corpórea
Cps	contagens por segundo
CV	coeficiente de variabilidade
CXP	potencial de saída da cela de colisão
CYP	citocromo
DE	disfunção erétil
DMHA	dimetilhexilamina
DMPG	(3,4-dimetoxi-fenil)glioxal
DMSO	dimetil sulfóxido
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
ES	ionização por electrospray

FAB	bombardeamento rápido de átomos
fmol	fantomol
GC	guanilato ciclase
GMP	guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
H_2O	água
HCl	ácido clorídrico
HP	hipertensão pulmonar
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
i.v.	via intravenosa
KCl	cloreto de potássio
Ke	constante de eliminação
KH_2PO_4	fosfato de potássio monobásico
LIQ	limite inferior de quantificação
M	Molar
m/z	Massa/carga
MALDI	dessorção de íons induzida por laser
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
$MgSO_4$	sulfato de magnésio
MRM	monitoramento de reações múltiplas
MS	espectrômetro de massa
N_2	nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
$NaHCO_3$	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico
O_2	oxigênio
PDE	fosfodiesterase
PDEs	fosfodiesterases
PGE1	prostaglandina E1
PKG	proteína quinase
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
S/N	sinal-ruído
SNP	nitroprussiato de sódio
$T_{1/2}$	tempo de meia-vida
UV	ultra violeta
v.o.	via oral
Vd	volume de distribuição
VIP	peptídeo vasoativo intestinal
λ	comprimento de onda

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Acetato de amonia	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Acetonitrila	J. T. Baker (EUA)
Ácido Fórmico	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Albumina	Sigma (EUA)
AMP	Sigma (EUA)
AMPc	Sigma (EUA)
Carbonato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Citrato tri-sódico	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
DMSO	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
EDTA	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Éter	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Glucose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
GMP	Sigma (EUA)
GMPc	Sigma (EUA)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Hexano	J. T. Baker (EUA)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH_2PO_4	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Metanol	J. T. Baker (EUA)
$MgCl_2$	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
$MgSO_4.7H_2O$	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NADPH	Sigma (EUA)
$NaHCO_3$	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaOH	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Teofilina	Sigma (EUA)
Tris-HCl	Sigma (EUA)

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Caracterização e distribuição nos tecidos de fosfodiesterases.....	25
Tabela 2	Gradiente de eluição dos nucleotídeos em sistema HPLC-MS/MS.....	39
Tabela 3	Gradiente de eluição dos nucleotídeos em sistema HPLC.....	44
Tabela 4	Tempo de retenção dos compostos (HPLC-UV).....	44
Tabela 5	Parâmetros otimizados da Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Cela de Colisão (CXP), para as transições monitoradas em modo MRM dos nucleotídeos.....	50
Tabela 6	Validação do método para nucleotídeos.....	56
Tabela 7	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu sildenafil (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP.....	68
Tabela 8	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafil (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP...	69
Tabela 9	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do análogo uretana analisada em plasma de cão do grupo que recebeu análogo uretana (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP.....	71
Tabela 10	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu sildenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP.....	72
Tabela 11	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP.....	74
Tabela 12	Valores dos parâmetros farmacocinéticos do lodenafil analisada em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP.....	74

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estrutura molecular dos compostos em estudo.....	36
Figura 2	Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de AMP m/z 348.1 (fragmento m/z 136.3).....	51
Figura 3	Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de AMPc m/z 330.1 (fragmento m/z 136.3).....	52
Figura 4	Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de GMP m/z 364.1 (fragmento m/z 152.1).....	53
Figura 5	Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de GMPc m/z 346.3 (fragmento m/z 152.1).....	54
Figura 6	Cromatograma HPLC-MS/MS dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos, na concentração de 10,0 ng/ml. Cada cromatograma era observado separadamente os nucleotídeos, (A) AMP, (B) cAMP, (C) cGMP e (D) GMP.....	55
Figura 7	Cromatograma HPLC-MS/MS dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos, na concentração de 0,25 ng/ml. Cada cromatograma era observado separadamente os nucleotídeos, (A) AMP, (B) cAMP, (C) cGMP e (D) GMP.....	55
Figura 8	Curva de calibração dos padrões de nucleotídeos.....	56
Figura 9	Efeito da inibição de PDE5 plaquetária, por sildenafil e análogos de sildenafil, *in vitro*. Os resultados representam a média (% de inibição) ± D.P., n=4, * p< 0,05.....	58
Figura 10	Efeito da agregação plaquetária induzida por ADP. Os resultados representam a média (% de inibição) ± DP., n=5. *P<0,001, ** p<0,01, comparado com o grupo SNP.....	60

Figura 11 Cromatograma (HPLC-UV) dos análogos uréia, uretana e carbonato de lodenafil após 2 h de incubação em meio ácido..... 61

Figura 12 Cromatograma (HPLC-UV) dos análogos uréia (**A**), uretana (**B**) e carbonato de lodenafil (**C**) após 2 h de incubação em plasma humano..... 62

Figura 13 Perfil cromatográfico da metabolização de sildenafil nos tempo de 0 min (- - -), 5 min (—) e 30 min (⋯) de incubação com microssomas de rato..... 63

Figura 14 Perfil cromatográfico da metabolização dos análogos uréia (**A**), uretana (**B**) e carbonato de lodenafil (**C**) nos temo de 0 min (- - -), 5 min (—) e 30 min (⋯) de incubação com microssomas de rato..... 64

Figura 15 Cromatograma (HPLC-UV) da incubação com hepatócitos de ratos de amostra branco (**A**) e sildenafil (**B**), indicando os metabólitos formados após 30 min de incubação..... 65

Figura 16 Cromatograma (HPLC-UV) da incubação com hepatócitos de ratos de amostra carbonato de lodenafil (**A**), análogos uréia (**B**) e uretana (**C**), indicando os metabólitos formados após 30 min de incubação..... 66

Figura 17 Curva concentração-tempo da média da concentração do sildenafil (●) em plasma de cão do grupo sildenafil (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP..... 67

Figura 18 Curva concentração-tempo da média da concentração do dímero carbonato de lodenafil (●), lodenafil (○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo carbonato de lodenafil 1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP..... 69

Figura 19 Curva concentração-tempo da média da concentração do análogo uretana (●), lodenafil (○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo análogo uretana (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP..... 70

Figura 20 Curva concentração-tempo da média da concentração do sildenafil (●), e desmetil sildenafil (○) em plasma de cão do grupo sildenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP..... 72

Figura 21 Curva concentração-tempo da média da concentração do carbonato de lodenafil (●), lodenafil (○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP..... 73

RESUMO

No presente trabalho foi padronizado um novo método para a dosagem da atividade de fosfodiesterase *in vitro*, por HPLC-MS/MS. Este novo método conseguiu apresentar exatidão, precisão, sensibilidade e rapidez nas análises; monitorando os nucleotídeos (AMP, GMP, AMPc e GMPc).

O desenvolvimento de novos fármacos derivados de um protótipo aponta para a obtenção de moléculas com um melhor perfil farmacocinético ou uma melhor relação estrutura-atividade. Atualmente o sildenafil é considerado o principal fármaco para o tratamento de disfunção erétil. Neste trabalho, avaliaram-se novos compostos denominados análogos de sildenafil (carbonato de lodenafil, dímero uréia e dímero uretana).

Os análogos foram analisados quanto à atividade em PDE5 e agregação plaquetária humana, *in vitro*. Foi determinada a estabilidade destes compostos, em meio ácido e plasma humano, *in vitro*, além de seus possíveis metabólitos em microssomas e hepatócitos de rato *in vitro*, e os seus parâmetros farmacocinéticos via intravenosa e oral, em cão, *in vivo*.

Os resultados mostraram que os análogos de sildenafil inibem a atividade de PDE e não inibem a agregação plaquetária do mesmo modo que o sildenafil *in vitro*, no entanto potencializam a ação do doador de NO (SNP). Os análogos de sildenafil foram estáveis em meio ácido e em plasma humano. No ensaio de metabolização, os dímeros uréia e uretana não foram metabolizados, entretanto o carbonato de lodenafil foi metabolizado principalmente em lodenafil, *in vitro*. O carbonato de lodenafil é rapidamente biotransformado em lodenafil, após administração v.i. e v.o. em cão. Concluiu-se que este trabalho apresenta um novo método de dosagem de PDEs e uma nova perspectiva terapêutica para a disfunção erétil, representada pelo carbonato de lodenafil, o qual inibe concentração-dependente a atividade de PDE5.

Palavras-chave: Fosfodiesterase, Nucleotídeos cíclicos, GMPc, AMPc, Sildenafil, Análogos de sildenafil.

ABSTRACT

In the present work a new method for the dosage of the activity of phosphodiesterase was standardized in vitro, for HPLC-MS/MS. This new method obtained to present exactness, precision, sensitivity, and rapidity in the analyses; monitoring the nucleotides (AMP, GMP, cAMP and cGMP).

The development of new drug derived from an archetype points with respect to the molecule attainment with one better pharmacokinetic profile or one better relation structure-activity. Currently the sildenafil is considered the main drug for the treatment of erectile dysfunction. In this work, we evaluate new analogous called composites of sildenafil (carbonate of lodenafil, dimer urea and dimer uretana).

The analogous ones had been analyzed how much the activity in PDE5 and platelet aggregation human being, in vitro. The stability of these composites was determined, in human acid way and plasma, in vitro, beyond its possible metabolites in microsomes and hepatocytes of rat in vitro, and its pharmacokinetic profile after intravenous and oral, in dog, in vivo.

The results had shown that the analogous of sildenafil inhibit the activity of PDE and they do not inhibit the platelet aggregation in a similar way that the sildenafil in vitro, however potencializam the action of the giver of NO (SNP). The analogous ones of sildenafil are presented steady in human acid way and plasma. In the metabolization assay, metabolization of dimer urea and dimer uretana was not observed, however the lodenafil carbonate was metabolizado mainly in lodenafil, in vitro. The lodenafil carbonate quickly is biotransformation in lodenafil, after administration v.i. and v.o. in dog. We conclude that this work presents a new method for analyze activity of PDEs and a new therapeutically perspective for the erectile dysfunction, represented for lodenafil carbonate, which inhibits concentration-dependent the activity of PDE5.

Word-key: Phosfodiesterase, Cyclic Nucleotide, GMPc, AMPc, Sildenafil, Analogous of sildenafil.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs) foram, inicialmente, descritas pelo grupo de Sutherland (Rall e Sutherland, 1958; Butcher e Sutherland, 1962), apresentando como principais funções na célula finalizar o sinal deflagrado pelos nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc (Beavo et al., 1995), catalisando a reação de hidrólise da união de 3`-fosfoester sobre o AMPc ou GMPc, transformando, estes segundos mensageiros em seus metabólitos inativos 5`-nucleotídeos (AMP ou GMP) (Texeira et al., 1997; Torphy, 1998). Em vários tecidos, principalmente no músculo liso, os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc estão diretamente envolvidos na diminuição da concentração do cálcio intracelular, causando o relaxamento das células musculares lisas.

A formação do AMPc é estimulada pela ligação de vários neurotransmissores e hormônios ao seu respectivo receptor acoplado à proteína G. Entre as diversas substâncias vasodilatadoras estimuladoras da atividade da adenilato ciclase (AC) e formação do AMPc no tecido muscular liso vascular, como no corpo cavernoso, podemos relacionar: peptídeo vasoativo intestinal (VIP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), prostaglandina E1 (PGE1) e adenosina (Torphy, 1998). Assim como o AMPc, o segundo mensageiro GMPc modula a atividade de proteínas quinases específicas e, deste modo, regula diversas funções intracelulares, resultando principalmente no relaxamento do músculo liso vascular (Burnett, 1997).

O óxido nítrico (NO) é um mediador, não adrenérgico e não colinérgico, envolvido na fisiologia da musculatura lisa vascular periférica, cuja ação é mediada por GMPc. Após a produção e liberação, o NO liga-se a porção heme da guanilato ciclase (GC). Esta, uma vez ativada, catalisa a formação de GMPc a partir da guanosina 5`-trifosfato (Corbin e Francis, 1999). O GMPc atua em proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) que após promoverem a fosforilação de proteínas específicas, resultam em acúmulo de Ca^{+2} no interior do retículo endoplasmático celular, e conseqüentemente o relaxamento da musculatura lisa local (Corbin e Francis, 1999).

1.1.1- Classificação

A superfamília das PDEs inclui vários genes diferentes agrupados em 11 famílias distintas (Tabela 1) (Beavo, 1995; Francis et al., 2001; Houslay e Adams, 2003; Uckert et al., 2006). Estas enzimas diferem entre si na especificidade pelo substrato, sensibilidade a inibidores e localização (Francis et al., 2001), podendo regular várias funções, incluindo produção e ação de mediadores pró-inflamatórios, canais iônicos, contração muscular, diferenciação, apoptoses, lipogenesis, glicogenoses e gluconeogenesis (Perry e Higgs, 1998) como também as funções cardíacas, a resposta erétil e a fototransdução (Juilfs et al., 1999).

No fim de 1970 começaram os estudos cinéticos das PDEs, clareando o potencial inibitório de várias moléculas orgânicas pequenas nesta enzima (Levin e Weiss, 1976; Hidaka et al., 1984; Wells et al., 1981; Wood e Hess, 1989). A carência terapêutica para as doenças relacionadas às proteínas de PDEs acarretou a pesquisa e desenvolvimento de inibidores de PDEs cada vez mais específicos, crescendo anualmente novas patentes de fármacos. Três fármacos que agem na PDE5 (sildenafil, vardenafil, tadalafil) e quatro fármacos que atuam em PDE3 estão sendo comercializados. Dois candidatos a inibidores da PDE4 estão esperando a aprovação. Atualmente, aproximadamente 20 inibidores de PDE4 estão sendo submetidos a estudos clínicos, e há centenas de compostos relacionados em estágio de desenvolvimento como inibidores das PDEs (Jeon et al., 2005). Os avanços recentes em compreender a estrutura tridimensional das PDEs e seus inibidores conduziram às descobertas de farmacos e a otimização racional dos compostos de ligação. As estruturas tridimensionais dos domínios catalíticos de PDE1, 3, 4, 5 e 9 são atualmente conhecidas. O conhecimento destas estruturas tridimensionais das PDEs possibilita investigar o mecanismo de ligação dos inibidores e substratos na enzima, permitindo otimizar adicionais inibidores. (Xu et al., 2000; Xu et al., 2004; Lee et al., 2002; Huai et al., 2003a; Huai et al., 2003b; Huai et al., 2004a; Sung et al., 2003; Scapin et al., 2004; Zhang et al., 2004; Huai et al., 2004b).

Tabela 1- Caracterização e distribuição nos tecidos de fosfodiesterases

Família	Características	Substrato	Localização
PDE1	Estimulada por Ca^{+2} / Calmodulina	GMPc e AMPc	Cérebro, Coração, rim, fígado, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.
PDE2	Estimulada por GMPc	AMPc > GMPc	Córtex adrenal, cérebro, corpo cavernoso, rim, fígado, coração, músculo liso visceral e músculo esquelético.
PDE3	Inibida por GMPc	AMPc	Corpo cavernoso, coração, plaquetas, músculo liso vascular e visceral, fígado, rim.
PDE4	Específica para AMPc	AMPc	Rim, pulmão, mastócitos, coração, músculo esquelético, músculo liso vascular e visceral.
PDE5	Específica para GMPc	GMPc	Corpo cavernoso, plaquetas, músculo esquelético, músculo liso visceral e vascular.
PDE6	Específica para GMPc fotoreceptor	GMPc	Retina.
PDE7	Específica para AMPc	AMPc	Músculo esquelético, coração e linfócitos.
PDE8	Específica para AMPc	AMPc	Testículo, ovário, intestino baixo e cólon.
PDE9	Específica para GMPc	GMPc	Baço, intestino e cérebro.
PDE10	Hidrolisa GMPc, inibida por AMPc	AMPc < GMPc	Cérebro, testículo e tiróide.
PDE11	Ligação com dois GMPc	AMPc e GMPc	Células esqueléticas, próstata, bexiga, células secretoras, testículos, fígado e rim

1.1.2- Estrutura

Estruturalmente as PDEs são proteínas homodiméricas (Jin et al., 1992), cada subunidade apresenta três domínios funcionais: um N-terminal regulatório um conservado centro catalítico, e um C-terminal (Thompson, 1991; Bolger, 1994). Os domínios regulatórios N-terminais variam extensamente entre as classes de PDEs. Este domínio está envolvido pelo centro catalítico, e possui regiões que auto-inibem o domínio catalítico, como também seqüencias que caracterizam sua localização subcelular (Houslay e Adams, 2003; Sonnenburg et al., 1995). O domínio N-terminal regulatório

apresenta uma região de ligação para calmodulina na PDE1, um sítio de ligação para GMPc na PDE2, um sítio de fosforilação para várias proteínas kinases nas PDE1-5 e uma região de ligação transducional na PDE6.

Todas as PDEs apresentam um conservado domínio catalítico de aproximadamente 270 aminoácidos (18-46% da seqüência idêntica) no carboxi terminal. Um espaço hidrofóbico denso é formado na interfase do domínio catalítico, sendo dividido por quatro subsítios: um sítio de ligação-metal (sítio M), um espaço central (espaço Q), um espaço hidrofóbico (espaço H) e uma região de fechamento (região L). (Sung et al., 2003). O sítio M é uma base de ligação para vários átomos de metais, cuja seqüência de aminoácidos apresenta–se completamente conservada em todos os membros da família de PDEs. Os metais de ligação desta região são o zinco e o magnésio (Percival et al., 1997; Laliberte et al., 2000; Kovala et al., 1997; Francis et al., 1994). Estes íons atuam na estabilização da estrutura enzimática e ativação da hidroxilação para mediar a catálise enzimática.

1.1.3- Fosfodiesterase 5

Inicialmente, a atividade enzimática especifica para GMPc da PDE5 foi descrita e caracterizada em plaquetas pelo grupo de Hamet (Hamet e Coquil, 1978; Coquil et al., 1980). Mais tarde, estudos com proteínas kinases dependentes de GMPc e outras proteínas ligadas ao GMPc no tecido pulmonar, também identificaram PDE5 como uma das principais proteínas ligadas a GMPc neste tecido (Francis et al., 1980).

A PDE5 é uma enzima homodimérica, constituída por duas subunidades idênticas de ~99 kDa. Cada subunidade é uma proteína quimérica compreendendo, ambas, um domínio catalítico terminação carboxi com ligação metal e um domínio regulatório (alostérico) terminação amino (Corbin et al., 2004). A estrutura básica para a ligação com alta afinidade para o GMPc na PDE5 ficou estabelecida com a identificação de dois domínios GAF (GAF-A e GAF-B) altamente homólogos, presentes na região do domínio regulatório. A ligação destes nucleotídeos cíclicos nos domínios é 100 vezes mais seletiva,

para GMPc quando comparada ao AMPc (Zoraghi et al., 2005). A ligação de GMPc para o domínio GAF-A estimula a atividade enzimática de 9 para 11 vezes, como também o bloqueio deste inibe a atividade enzimática. Sugerindo que a enzima pode ficar inativa na ausência do ligante no domínio GAF-A (Rybalkin et al., 2003). Entretanto, fisiologicamente, o domínio GAF-A é diretamente ligado ao GMPc, conseqüentemente sempre ativo (Bender e Beavo, 2006). Os inibidores de PDE5 ligam exclusivamente no domínio catalítico.

Para as PDE5 apenas um gene foi encontrado. Entretanto, três variantes do RNAm e da proteína de PDE5 foram identificadas em animais e em tecidos humanos (Loughney et al., 1998; Kotera et al., 1999; Lin et al., 2000; Lin, 2004). As três variantes (PDE5A1-PDE5A3) diferem em seus N-terminais, e em todas seus éxons possuem uma seqüência comum de 823 aminoácidos. A região promotora da PDE5 é induzida pelo GMPc. O aumento nos níveis de GMPc leva ao aumento da expressão do gene de PDE5 por feedback-negativo (Lin et al., 2001).

A PDE5 é considerada uma proteína citosólica. Nos roedores, níveis elevados de RNAm de PDE5 foram localizados em músculo liso vascular, coração, placenta, músculo esquelético, pâncreas, cérebro, fígado, pulmão, rim e diversos tecidos gastrintestinais (Loughney et al., 1998; Stacey et al., 1998; Yanaka et al., 1998; Kotera et al., 2000; Giordano et al., 2001). As proteínas da PDE5 também são expressas em plaquetas e são altamente elevadas em músculo liso, incluindo o tecido vascular peniano. No cérebro, as proteínas de PDE5 também foram encontradas, particularmente, nos neurônios de Purkinje (Shimizu-Albergine et al., 2003).

Atualmente, as companhias farmacêuticas encontraram um sucesso maior na comercialização dos inibidores de PDE5 do que com os inibidores de todas as outras famílias de PDEs. Este sucesso é atribuído aos fármacos intensamente prescritos como o sildenafil, vardenafil, e tadalafil. Estes farmacos provaram ser eficazes para o tratamento da disfunção erétil e também estão sendo testadas para outras circunstâncias patológicas. Uma das funções mais estudada das PDE5 é como regulador da contração do músculo liso vascular do corpo cavernoso por GMPc. Dois tecidos de evidência deste papel são o pulmão e tecido vascular do corpo cavernoso. No músculo liso vascular do corpo caveroso,

a inibição PDE5 potencializa o relaxamento do músculo liso pelo NO e GMPc estimulando desse modo a ereção peniana (Rosen e Kostis, 2003; Corbin, 2004).

No pulmão, a inibição de PDE5 opõe a vasoconstrição do músculo liso, e os inibidores PDE5 já estão em experimentações clínicas para o tratamento de hipertensão pulmonar (Lewis e Semigran, 2004; Steiner et al., 2005) como também para o tratamento de hipertensão pulmonar neonatal (Hoeper, 2005; Humpl et al., 2005). Entretanto, ainda não há conclusões se a eficácia neste caso requer uma estimulação maior da guanilato ciclase. Outro papel de PDE5 é sua importância na regulação da agregação plaquetária. A inibição de PDE5 na presença de NO, aumenta GMPc plaquetário e potencializa o efeito inibitório de NO sobre a agregação plaquetária e funções secretoras (Ito et al., 1996; Dunkern e Hatzelmann, 2005). Esta inibição da função plaquetária, envolve com o aumento dos níveis de GMPc, uma inibição de PDE3 e subsequentemente o aumento dos níveis de AMPc (Maurice & Haslam, 1990). Atualmente é também estudada a participação de PDE5 em funções de aprendizagem e memória (Prickaerts et al., 2004) e na função cardíaca (Das et al., 2002, 2005; Hassan e Ketat, 2005).

1.2- Métodos de dosagem da atividade de fosfodiesterases

Os métodos de dosagem da atividade de PDEs identificam e quantificam apenas um dos nucleotídeos da reação de hidrólise enzimática. Nos últimos anos, as duas principais técnicas para a determinação da atividade das PDEs foram: O método de Thompson e Appleman (1971), o qual foi utilizado extensamente por mais de três décadas, usava substratos AMPc e GMPc marcado com trítio e a reação de PDEs é seguida pela atividade 5`nucleotidase do veneno de serpente. A concentração de adenosina marcada no sobrenadante é medida indiretamente após imobilização de substrato não reativo na resina de troca iônica. Recentemente esta análise foi adaptada para viabilidade do método em placas de 96 poços (Qiu et al., 2003).

A outra técnica utiliza precipitação seletiva, na qual é medido [^{3}H]AMPc no sobrenadante ou no precipitado (Schilling et al., 1994). Novas análises de PDEs foram adequadas para métodos de cintilação, e este representa um dos métodos contemporâneos mais extensamente utilizados (Fawcett et al., 2000; Bardelle et al., 1999).

Os métodos descritos para a análise quantitativa destes nucleotídeos cíclicos requerem substrato radioativo especial como [^{3}H]-GMP (Alajoutsijarvi & Nissinen, 1987), ou substrato fluorogênico como 2´-*O*-antraniloil-GMPc e 2´-*O*-metil-antraniloil-GMPc (Hiratsuka, 1982).

O método baseado na fluorescência tem os limites de detecção de ~20 fmol com 30% de variabilidade para o substrato marcado (Alajoutsijarvi & Nissinen, 1987). Limites de detecção de 2 fmol para os nucleotídeos cíclicos são possíveis usando o método de imunoensaio (Pradelles et al., 1989). Embora estes métodos sejam sensíveis ambos requerem longo tempo de análise e permitem a determinação da atividade de PDEs pela análise de somente um composto por vez. Recentemente o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando o reagente de derivação de fluorescência (3,4-dimetoxi-fenil)glioxal (DMPG) obteve um limite de detecção (S/N=3) para GMP de 50 fmol com um tempo de analise mais curto, sendo o tempo de corrida total de 20 minutos (Ohba et al., 2001).

A detecção em espectrometria de massa (MS), de compostos polares intactos tem-se tornado agora possível por causa do desenvolvimento de técnicas de ionização sofisticadas. Os métodos de ionização geralmente utilizados para os nucleotideos são: bombardeamento rápido de átomos (FAB) (Newton et al., 1995; Wolter et al., 1995), a dessorção de íons induzida por laser (MALDI) (Nordhoff et al., 1994) e electrospray (ES) (Straub e Voyksner, 1993). No campo da química dos nucleotídeos, a ionização FAB-MS foi uma grande etapa para prosseguir com alto potencial a identificação de nucleotídeos cíclicos (Newton et al., 1995; Newton et al., 1989; Newton et al., 1991). Witters e colaboradores, em 1996, mostraram que os nucleotídeos cíclicos (AMP e GMP), podem ser identificados utilizando específica dissociação ativada por colisão (CAD), obtendo íons produtos também identificados após fragmentação.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um método de separação química, utilizado para purificação inicial da amostra avaliada, e como introdutor das diferentes substâncias separadas para o dispositivo de análise, que neste caso é o espectrômetro de massa (MS). A análise do HPLC acoplada à espectrômetro de massa alia o poder de separação de HPLC à especificidade do espectrômetro de massa como detector (Fountain, 2002; Lee, 2005).

Um dos métodos atualmente utilizados para o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa é o electrospray (ES), que permite a ionização de compostos não voláteis normalmente analisados por HPLC (Fountain, 2002).

Os analisadores dos espectrômetros de massa separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga (m/z) de cada uma, a partir da qual se determinará a abundância e massa de cada espécie iônica. Um dos quatro tipos mais comuns de analisadores é o quadrupolo. Os íons formados no electrospray entram no primeiro quadrupolo do espectrômetro, onde será separada, por potencial elétrico e radiofreqüência, apenas as moléculas com a relação massa/carga desejada (íon precursor). No quadrupolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com gás inerte (argônio ou nitrogênio) e produz fragmentos também carregados. Estes são denominados íons filhos (ou íon produto) e são característicos para cada substância. Os íons filhos são separados no terceiro quadrupolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação massa/carga são selecionados, pois só eles atravessarão o quadrupolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho, que poderá distinguir íons cuja massa difere em menos de um Dalton. E todos os demais íons são refletidos e perdidos nas laterais do aparelho (Fountain, 2002; Lee, 2005).

Este método analítico é altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas e advindas do cromatógrafo, o primeiro quadrupolo irá separar somente a de massa/carga desejada. Porém, caso haja mais de uma com a mesma relação, a colisão que se dá no segundo quadrupolo irá formar novas espécies, que serão definitivamente separadas no terceiro, restando somente o íon desejado para o analisador.

1.3- Disfunção erétil

A disfunção erétil (DE) pode ser definida como a "incapacidade de alcançar ou manter uma ereção (peniana) adequada para a satisfação sexual" (*National Institutes of Health Consensus Statement*, 1993). Estudos demonstraram que a prevalência da DE

aumenta significativamente com a idade. No Brasil 46% dos homens com 40-70 anos são afetados com algum grau de DE (Moreira et al., 2003) Embora a DE possua tanto componentes orgânicos bem como componentes psicogênicos, sabe-se que esta disfunção está tipicamente associada com a aterosclerose e seus fatores de risco como as dislipidemias, tabagismo, hipertensão, diabetes mellitus, sedentarismo e obesidade (Feldman et al., 2000). A disfunção erétil ocorre em grau variável e apresenta-se associada a efeitos adversos sobre a qualidade de vida, particularmente sobre o bem-estar pessoal e inter-relações familiares e sociais (Johannes et al., 2000).

As recentes aplicações de sofisticadas técnicas clínicas e científicas no estudo dos mecanismos centrais (vias cerebrais e espinhais) e locais (músculo liso e endotélio) da ereção peniana levou a grandes avanços no gerenciamento clínico da disfunção erétil. Durante a última década, foi observado um grande avanço no tratamento da disfunção erétil, o qual se estende desde técnicas cirúrgicas (próteses penianas ou revascularização) até o desenvolvimento recentemente de uma terapia oral eficaz (citrato de sildenafil). A eficácia de agentes administrados por via oral como o sildenafil, tadalafil, vardenafil e apomorfina, representa o início de terapias farmacológicas não invasivas no tratamento da DE.

1.4- Sildenafil

Na década de 80 o laboratório Pfizer (Reino Unido), pesquisava a possibilidade terapêutica de modular níveis de GMPc para o tratamento de falência cardíaca. Nesta época nitratos já eram usados para o tratamento de patologias cardiovasculares, particularmente angina pectoris (Marsh e Marsh, 2000). O objetivo da pesquisa era modular a via NO/GMPc. Nesta época cinco subtipos de PDE foram identificados, entre estas PDE5, em músculo liso vascular e em plaquetas.

Em 1986 com a finalidade de desenvolver um inibidor seletivo de PDE5, foi sintetizado um novo composto pirazolopirimidina, inibidor potente de PDE5, sendo designado quimicamente como 1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-

pirazolo [4,3- d]pirimidin -5- il) fenilsulfonil]-4 -metilpiperazina, e inicialmente denominado UK-92,480, mais tarde conhecido como sildenafil (Ghofrani et al., 2006). Em 1991, estudos com pacientes com angina envolvendo administração intravenosa demonstraram moderado efeito vasodilatador. Ano seguinte, estudos com múltiplas doses com sildenafil para investigar a farmacocinética, farmacodinâmica e tolerância em voluntários sadios, foi observado dores de cabeça, rubor, indigestão e dores musculares, como também ereção peniana como efeito colateral. Visto as poucas vantagens de sildenafil como tratamento de angina, devido $T_{1/2}$ curto e interação com nitratos nestes pacientes, a pesquisa com sildenafil foi voltada para o tratamento da DE.

Por volta de 1997, 21 estudos clínicos, com mais de 4.500 voluntários, já tinham sido realizados, demonstrando a eficácia do sildenafil na DE, em uma população variada de pacientes. Os principais efeitos colaterais relacionados à dose eram dores de cabeça (18%), rubor (11%), indigestão (7%), congestão nasal (5%) e distúrbios visuais (2%) (Goldstein et al., 1998) provavelmente pela inibição não específica com outras PDEs, como a PDE6, presente na retina. Clinicamente uma das principais contra-indicações do uso de sildenafil é no tratamento com nitratos para doenças isquêmicas da artéria coronária (Goldstein et al., 1998; Morales et al., 1998), devido ao fato de que a combinação de nitratos com sildenafil resulta em grave hipotensão sistólica.

No começo de 1998 o FDA aprova sildenafil (Ghofrani et al., 2006), o primeiro de uma nova classe de compostos para o tratamento de DE por administração oral. É um inibidor potente e seletivo da PDE5, que é a principal PDE responsável pela degradação de GMPc no corpo cavernoso (Boolell et al., 1996; Ballard et al., 1998; Corbin & Francis, 1999; Langtry & Markham 1999),. Esta inibição causa aumento dos níveis de GMPc, resultando em relaxamento do músculo liso e influxo de sangue no corpo cavernoso. Esta substância potencializa os relaxamentos mediados pelo NO em corpo cavernoso de coelho (Jeremy et al., 1997; Chuang et al., 1998) e humano (Ballard et al., 1998; Moreland et al., 1998).

O FDA aprovou em 2003 dois novos inibidores de PDE5, o vardenafil, estruturalmente semelhante ao sildenafil, com alta seletividade para PDE5, mas em menor grau para a PDE6, comparado com sildenafil; e o tadalafil, estruturamente não comparável

ao sildenafil, é inibidor seletivo para PDE5, apresentando considerável seletividade para a PDE11 (Ballard et al., 1998; Phillips et al., 2002). Tadalafil é caracterizado por apresentar moderado efeito após 24 horas de ingestão de uma única dose oral (Padma-Nathan et al., 2001) Atualmente estes novos fármacos representam a primeira linha terapêutica oral para o tratamento de disfunção erétil.

A estrutura molecular de sildenafil e vardenafil difere da estrutura de tadalafil, entretanto as três moléculas contêm um sistema de anel duplo heterocíclico nitrogenado, simulando a base purina do GMPc, o qual interagem no mesmo sítio catalítico da PDE5. A base purina do GMPc liga-se ao grupo alfa amino da Gln-817 no espaço Q do sitio catalítico da PDE5, através de ligações de hidrogênio (Carson e Lue, 2005). Do mesmo modo o grupo pirazolopirimidinona do sildenafil interage com a Gln-817 e Tyr-612 além de interações hidrofóbicas com outros aminoácidos nesta região (Sung et al., 2003; Carson e Lue, 2005). Esta interação pode ser 1.000 vezes mais forte para os inibidores do que para GMPc (Corbin et al., 2004). O grupo etoxifenil do sildenafil interage hidrofobicamente com o espaço H, variações nesta região da enzima são responsáveis pela seletividade aos inibidores (Jeon et al., 2005). O grupo metilpiperazina do sildenafil interage com a região L, limitando estericamente o acesso para o sítio ativo da PDE5 (Sung et al., 2003).

A farmacocinética do sildenafil é característica por apresentar rápida absorção após administração oral, com biodisponibilidade absoluta em torno de 41%, aproximadamente (Nichols et al., 2002), atinge concentrações plasmáticas em 30 a 120 minutos (doses em estado de jejum). Quando ingerido junto a uma refeição calórica, a taxa de absorção é reduzida, conseqüentemente o valor de $T_{máx}$ retarda em 60 minutos e o valor de $C_{máx}$ reduz 29%. Aproximadamente 96% do sildenafil e seu principal metabólito ligam-se nas proteínas plasmáticas. Sildenafil é metabolizado no fígado pelo complexo citocromo P450 e convertido principalmente em desmetil sildenafil (UK-103,320) e outros metabólitos (Walker et al., 1999; Warrington et al., 2000). O metabólito desmetil sildenafil apresenta similar inibição de PDE5 comparado ao sildenafil (Langtry e Markham, 1999), com meia-vida de quatro horas e excretado como metabólito, nas fezes (80%) e na urina (13%) (Boolell et al., 1996; Cooper et al., 1997).

Recentemente, sildenafil também é alvo de estudo na hipertensão pulmonar (HP). O tratamento de longo prazo (três meses) com sildenafil oral melhorou a capacidade de realizar exercícios e a qualidade de vida em pacientes com hipertensão pulmonar grave (Lodato, 2001). Michekalis *et al*. (2002) demonstraram que o sildenafil oral em dose única é um potente e seletivo vasodilatador pulmonar. O sildenafil foi também utilizado com resultados satisfatórios descritos por Watanabe *et al.* (2002) em pacientes portadores de HP primária e secundária.

1.4.1- Impacto econômico

A introdução do sildenafil como terapêutico revoluciona o tratamento de DE. Em poucas semanas de sua comercialização no mercado americano mais de um milhão de prescrições foram feitas com sildenafil. Em 2001 sildenafil foi aprovado em mais de 110 países, e prescrito em mais de 20 milhões de pacientes no mundo, considerando também que mais de 4 milhões tem feito uso de tadalafil para o tratamento de DE (Carson e Lue, 2005). No mundo inteiro em 2003, as vendas de sildenafil excedeu 2,1 bilhões de dólares (Jeon et al., 2005). Até 2006, mais de 750.000 médicos prescrevem sildenafil para 23 milhões de homens, considerado até o momento sildenafil é o mais extensamente usado para o tratamento de DE (Ghofrani et al., 2006; Jackson e Osterloh, 2005).

1.5- Análogos de sildenafil

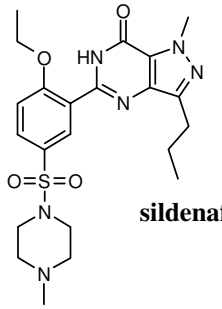
O desenvolvimento de novos fármacos, derivados de um protótipo ou pertencentes a uma determinada classe, aponta para a obtenção de moléculas com um melhor perfil farmacocinético ou uma melhor relação estrutura-atividade (Bellissant et al., 1996).

Atualmente, pesquisadores investem em diferentes métodos para buscar um fármaco ideal no tratamento de doenças, ou para minimizar os efeitos colaterais destes fármacos. Para isto, novos compostos estão em estudos pela modificação de drogas através

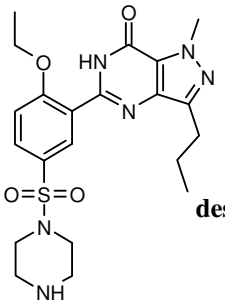
da união de dois compostos, ou a implantação de moléculas em fármacos de referência vêm sendo realizados.

Do mesmo modo a pesquisa e desenvolvimento de inibidores mais seletivos para PDE5 é de grande interesse, principalmente para o tratamento de DE, possibilitando minimizar os efeitos colaterais de sildenafil. Nos últimos anos vários compostos têm sido sintetizados por meio de modificações na estrutura molecular de sildenafil, estes são denominados análogos de sildenafil. O grupo de pesquisa de Kim *et al.* (2001a) sintetizou o fechamento do anel fenil do sildenafil, mas esta estrutura inibiu PDE5 e PDE6, com menor eficácia que sildenafil e baixa seletividade para PDE6. Outras tentativas de adicionar grupo N-acilamido no anel fenil do sildenafil conseguiram inibir PDE5 e PDE6, com maior eficácia que sildenafil (kim et al., 2001b), entretanto com baixa seletividade para PDE6 comparada ao sildenafil. Outro grupo de pesquisa de Allerton *et al.* (2006) trabalhou com a adição de vários grupos químicos no sildenafil e conseguiu obter uma inibição de PDE5 tanto quanto de sildenafil, com alta seletividade para PDE5 em relação a PDE6. Recentemente um novo análogo de sildenafil, denominado aildenafil, está sendo avaliado em estudo clínico de fase III (Wang et al., 2007).

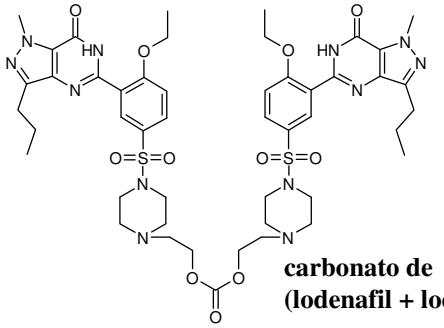
Visando minimizar os efeitos adversos do sildenafil, ou melhorar sua farmacodinâmica ou farmacocinética, como também as vantagens econômicas pela possibilidade de adquirir um tratamento de DE mais acessível no Brasil, concorrente ao sildenafil, o grupo de pesquisa do laboratório Cristália sintetizou análogos de sildenafil. Os análogos foram sintetizados, por meio da combinação de moléculas de lodenafil e desmetil sildenafil com grupos carbonato, uréia ou uretana (Figura 1).



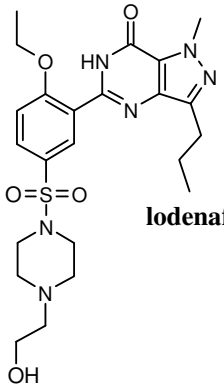
sildenafil



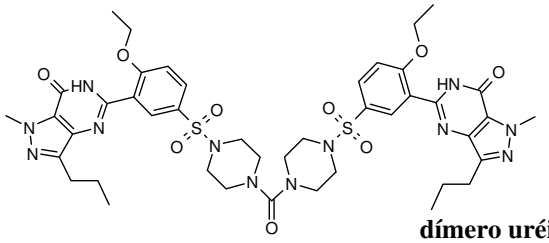
desmetil sildenafil



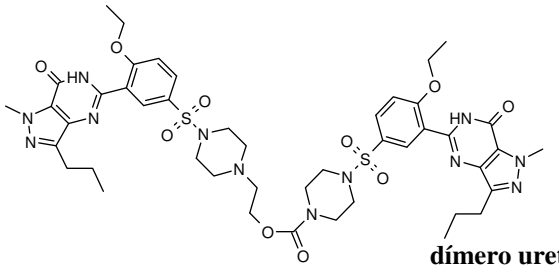
carbonato de lodenafil
(lodenafil + lodenafil)



lodenafil



dímero uréia
(desmetil sildenafil + desmetil sildenafil)



dímero uretana
(lodenafil + desmetil sildenafil)

Figura 1- Estrutura molecular dos compostos em estudo

1.6- Objetivos

1.6.1- Objetivo Geral

Padronização de um novo método para avaliar atividade de PDEs por HPLC-MS/MS.

Avaliação de análogos de sildenafil sobre PDE5 e análise dos parâmetros farmacocinéticos.

1.6.2- Objetivos específicos

Padronizar um novo método de dosagem da atividade enzimática de fosfodiesterases utilizando técnica HPLC-MS/MS, identificando simultaneamente os nucleotídeos cíclicos e não cíclicos (GMPc, AMPc, GMP e AMP).

Avaliar a ação dos análogos de sildenafil na atividade de fosfodiesterase e na agregação plaquetária humana, *in vitro*.

Obter o grau de estabilidade dos análogos de sildenafil em plasma e em meio ácido.

Caracterizar o perfil metabólico dos análogos de sildenafil em microssomas e hepatócitos de rato, *in vitro*.

Analisar a cinética dos análogos de sildenafil pela via intravenosa e oral em cão, *in vivo*.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Atividade de fosfodiesterases por método HPLC-MS/MS

2.1.1- Padronização

2.1.1.1- Protocolo experimental

O sistema HPLC-MS/MS era constituído por um cromatógrafo líquido modelo Shimadzu LC ADVp (Shimadzu Corporation, Japão), com auto-injetor (temperatura 6,5^{o}C) e pré-coluna C18 Jones (1cm x 4mm, 4μm) com coluna analítica Jones C18 (100mm x 2,1mm, 4 μm). O gradiente de eluição era composto pelas fases A (água com acido fórmico 10 mM) e B (acetonitrila com acido 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, retornando o gradiente a 100% de A (Tabela 2). Era mantido fluxo de 0,35 ml/min. Tempo de corrida total de 10 min. O volume de injeção de cada amostra era 40 μl.

Tabela 2- Gradiente de eluição dos nucleotídeos em sistema HPLC-MS/MS

Tempo (min)	**Fase A (%)**
0-2	100
7	40
9-10	100

O sistema cromatográfico era acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo modelo API 4000 (PE Sciex, Toronto, Canadá). As condições de ionização das soluções padrões de GMPc, GMP, AMPc e AMP no espectrômetro de massa foram apresentadas no modo íon positivo (ES+), com gás de colisão desligado, com temperatura da fonte de 400 ^{o}C, e voltagem da fonte 5.500 V. Com gás de colisão (nitrogênio) ligado, com pressão de 7,0 psig era observado os principais fragmentos de cada molécula e pelo modo MRM (Monitoramento de Reação Múltiplas) os principais fragmentos eram selecionados.

2.1.1.2- Curva de calibração e limite de quantificação

A curva de calibração do método foi preparada com solução padrão da mistura dos nucleotídeos (GMPc, GMP, AMPc e AMP), em uma concentração inicial de 100 ng/ml. Diluídas em sete concentrações diferentes (0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 ng/ml), na solução matriz nas mesmas condições de ensaio. A curva de calibração foi realizada em duplicata. Os intervalos da curva foram analisados quanto a sua linearidade, exatidão e precisão compatíveis.

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. A razão sinal ruído da linha de base (maior que 5:1) foi especificada no método para determinação do LQ para cada nucleotídeo. Para determinar o LQ, amostras da mistura dos padrões de nucleotídeos foram quantificadas na concentração final de 0,5 e 0,25 ng/ml, sendo realizada oito amostras de cada concentração (total de 16 amostras). Os valores de acurácia foram calculados pela média dos valores dividida pelo valor padrão, e o coeficiente de validação calculado pelos valores de desvio padrão dividido pela média.

2.2- Atividade inibitória

2.2.1- Inibição da fosfodiesterase 5 *in vitro*

2.2.1.1- Procedimento experimental

Para cada análise, utilizou-se 60ml de sangue de voluntário sadio (ambos sexos, 25 - 45 anos). O sangue era coletado em 0,1 volume de citrato de sódio 3,13% e centrifugado a 200 x g, 15 min a 10^0C. O plasma rico em plaqueta (PRP), foi coletado e foi adicionado EDTA 10 mM. Centrifugou o PRP a 900 x g, 15 min a 10^oC. O pellet de plaqueta foi lavado com tampão Krebs (NaCl, 118 mM; $NaHCO_3$, 25 mM; glucose, 5,6mM; KCl, 4,7mM; KH_2PO_4, 1,2mM e $MgSO_4$ $7H_2O$, 1,17mM, pH 7,4) contendo EDTA 10mM e centrifugou novamente a 900 x g, 15 min a 10^oC.

Ressuspendeu as plaquetas em 3ml de tampão Krebs contendo 0,32 M de sucrose. Na suspensão de plaquetas ajustou a concentração para 1 x 10^9 plaquetas/ml. Estas foram homogeneizadas em sonicador de células por 10 s. A concentração protéica foi determinada através do *KIT DC Protéica Assay* com soro albumina bovina como padrão. O extrato de fosfodiesterase plaquetaria foi estocado a -80^0C.

A mistura padrão de reação enzimática (volume total de 200µl) incluía 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM $MgCl_2$ e extrato de PDE (concentração final de proteína 0,4mg / ml).

Os agentes em estudo (sildenafil, carbonato lodenafil, análogo uretana e uréia) foram diluídos em DMSO (concentração final na reação, < 0,05 % de DMSO), e pré-incubados na mistura enzimática por 5 min. Iniciou a reação por adição de GMPc 20µM e incubou a 35^0C por 30 min. A reação foi parada por aquecimento em banho de água fervente por 2 min. Por centrifugação 14000 rpm, 5 min, as proteínas foram precipitadas e removidas. As amostras foram mantidas a temperatura –20°C, até analise pelo método HPLC-MS/MS, de nucleotídeos (Item 2.1.1.1).

2.2.2- Agregação plaquetária

2.2.2.1- Procedimento experimental

Sangue humano de voluntários sadios (ambos os sexos, 25 - 45 anos), que não receberam qualquer medicamento durante 10 dias anteriores ao experimento, foi coletado em tubos de plástico contendo citrato tri-sódico 3,8 % (9 partes de sangue para 1 parte de citrato). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido coletando-se o sobrenadante da centrifugação do sangue total a 200 x *g*, em 25°C por 15 min. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2000 x *g*, em 25°C por 10 min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O sangue do mesmo indivíduo nunca foi usado mais de uma vez para o mesmo protocolo experimental.

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Chrono-Log Corporation) calibrado para 0% com PRP e 100% utilizando-se PPP.

Em cada ensaio foi utilizada uma amostra de 400 µl de PRP adicionada em cubetas siliconizadas, mantidas sob agitação constante a 37 ºC no agregômetro. As amostras foram mantidas nestas condições por 1 min antes da adição do agonista ou inibidor.

As plaquetas foram incubadas com sildenafil ou análogos (carbonato de lodenafil ou uréia ou uretana) (1 µM), por 2 min. PRP foi tratado com doador de NO (nitroprussiato de sódio, SNP) (0,1-3,0 µM), logo em seguida foi induzida a agregação plaquetária com uma dose sub-máxima de ADP (10 µM). Agregação foi monitorada por 5 min.

A resposta do agente agregante (ADP) foi definida como a diferença na transmissão da luz através da amostra de PRP após e antes da adição de ADP e expressada como porcentagem da máxima transmissão de luz (porcentagem de transmissão de luz (PPP) – transmissão de luz (PRP)).

2.3- Estudo de estabilidade

2.3.1- Estabilidade em meio ácido

A estabilidade de cada composto em estudo foi investigada em meio ácido (100 mM de ácido clorídrico à 37^{o}C). Em tubos de vidros (2 ml) foi adicionado solução de HCl 100 mM e aquecido a 37^{o}C, em seguida foi adicionado os compostos em estudo dissolvidos em DMSO (sildenafil e análogos carbonato de lodenafil, uréia e uretana), na concentração final de 10 µM. Uma alíquota (0,2 ml) era retirada imediatamente e colocada em tubos de vidros para análise (tempo 0 min), o restante era incubado a 37^{o}C em banho-maria com agitação. Alíquotas (0,2 ml) foram removidas no tempo de 30 min e 2 h de incubação. Incubação de cada composto foi realizada em tubos separados. Todas as amostras foram neutralizadas imediatamente por adição de 0,2 ml de NaOH (100 mM) e 50 µl de carbonato de potássio (1 M). A fase aquosa foi confirmada ser alcalina usando fita de indicador de pH. Os compostos foram extraídos tão logo possível com éter: hexano (80:20; 2 ml) e analisados por HPLC-UV (Item 2.3.3).

2.3.2- Estabilidade em plasma humano

A estabilidade de cada composto em estudo foi investigada em plasma humano, a 37^{o}C. Em tubos de vidros (2 ml) foi adicionado plasma humano e aquecido a 37^{o}C, em seguida foi adicionado os compostos em estudo dissolvidos em DMSO (sildenafil e análogos carbonato de lodenafil, uréia e uretana), na concentração final de 10 μM. Uma alíquota (0,2 ml) foi retirada imediatamente e colocada em tubos de vidros para analise (tempo 0 min), o restante foi incubado a 37 ^{o}C em banho-maria com agitação. Alíquotas (0,2 ml) foram removidas no tempo de 30 min e 2 h de incubação. Incubação de cada composto foi realizada em tubos separados. Todas as amostras foram extraídas tão logo possível com éter:hexano (80:20; 2 ml) após o primeiro ajuste de pH com carbonato de potássio (50 μl; 1M) e analisados por HPLC-UV (item 2.3.3).

2.3.3- Condições cromatográficas

Para a análise da estabilidade química e plasmática dos compostos (sildenafil e análogos carbonato de lodenafil, uréia e uretana), foi empregada técnica semi-analítica usando HPLC, identificando as moléculas por detector UV (ultravioleta). O sistema de HPLC em fase reversa consiste de duas bombas binárias, (LC-10Advp, *Shimadzu Scientific Instruments Inc. Kyoto, Japan*) e um detector de UV, SPD-10Avp. Todos os módulos foram controlados através da unidade SCL-10Advp, conectada a um computador executando o software ClassVP.

A cromatografia era realizada usando coluna Gênesis C18 (4 μm) de dimensões 150 x 4,6 mm. O comprimento de onda (λ) monitorado foi 292 nm. O fluxo no sistema foi 1,5 ml/min (a pressão para este fluxo, estava dentro dos limites aceitos). O gradiente apresentava 40% de fase A até 3 min, 10% de fase A em 8 min, retornando a 40% em 12 min de tempo de corrida total. As fases móveis consistem de: Fase A (água + acetato de amônia 50 mM); Fase B (acetonitrila + água (80:20) + acetato de amônia 50 mM) (Tabela 3).

Tabela 3- Gradiente de eluição dos compostos em sistema HPLC

Tempo (min)	Fase A (%)
0-3	40
8	10
12	40

Curva de calibração foi realizada na faixa de concentração de 1-10 μM dos padrões (sildenafil, lodenafil, desmetil sildenafil, análogos carbonato de lodenafil, uréia e uretana) na matriz em estudo. Os compostos foram extraídos e analisados por HPLC-UV. As moléculas foram detectadas e seu tempo de retenção registrado, sendo realizada a quantificação em diferentes concentrações, através da altura dos picos e da medida das áreas dos picos em comparação à área do pico no tempo zero.

No método desenvolvido para análise semi-quantitativa destes compostos, conseguiu detectar todas as moléculas em questão, sendo os tempos de retenção observados satisfatórios para prosseguir a análise (Tabela 4).

Tabela 4- Tempo de retenção dos compostos (HPLC-UV)

Compostos	Tempo de retenção (min)
desmetil sildenafil	2,03
lodenadil	2,48
sildenafil	4,02
análogo uréia	6,47
análogo uretana	7,00
carbonato de lodenafil	7,45

2.4- Metabolização *in vitro*

2.4.1- Estudo com microssomas de rato

Foram preparadas soluções estoque de 2 mM de sildenafil e análogos de sildenafil, dissolvidos em DMSO. A mistura de incubação (volume final de 500 µl) continha 1 mg/ml de concentração microssomal (microssomas de fígados de rato comprados da IVT, *In Vitro Technologies*, Lot: LMO, concentração inicial de 20 mg/ml), $MgCl_2$ 10 mM, cada composto (sildenafil e análogos de sildenafil) foi incubado na concentração final de 10 µM. Todos os tubos foram pré-incubados por 5 min em banho-maria a 37^{o}C. Para iniciar a reação foi adicionado uma alíquota (50 µl) de NADPH (sal tetrasodio em 2% e bicarbonato de sódio) e incubado a 37^{o}C em banho-maria com agitação constante nos tempos 5 e 30 min. Incubação foi terminada por rápida adição de 1 ml de metanol gelado seguido por mistura em vortex. Foi preparado um branco com os microssomas precipitados com metanol, antes da adição de sildenafil ou análogos de sildenafil. Todas as amostras foram extraídas tão logo possível com éter:hexano (80:20; 2 ml) e analisados por HPLC-UV, conforme condições de análise (item 2.3.3).

2.4.2- Estudo com hepatócitos de rato

Os hepatócitos de rato foram obtidos da *In Vitro Technologies*, (IVT; Baltimore, MD) (Lot MSE) para o experimento.

Para a incubação com hepatócitos, uma alíquota (0.5 ml) de suspensão de hepatócitos (aproximadamente 1 x 10^6 hepatócitos por ml) foi colocada em tubos plásticos de 15 ml. Os tubos foram colocados em banho de água com agitação a 37^{o}C por 5 min. Uma alíquota dos compostos sobre teste (2,5 µl de 2 mM em solução de DMSO) era adicionado nos tubos separados e a incubação continuava por 2 h a 37^{o}C. Os tubos eram misturados em aproximadamente 70 rpm. Um branco foi incluído no experimento e também hepatócitos sem substrato. No final do período de incubação, metanol gelado foi adicionado e as amostras imediatamente agitadas em vortex. Todas as amostras foram extraídas tão logo possível com éter:hexano (80:20; 2 ml) e analisados por HPLC-UV, conforme condições de análise (item 2.3.3).

2.5- Avaliação farmacocinética

2.5.1- Animais

Foram utilizados cães da raça "beagle" pesando entre 11 e 16 Kg, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). Os animais foram mantidos em temperatura e luminosidade controladas e alimentados com ração padrão. O protocolo experimental foi previamente aprovado pela comissão de ética animal da Unicamp (n° 317-1/2001).

2.5.2- Procedimento experimental

Os animais foram previamente identificados em 2 grupos. O grupo de administração endovenosa, recebendo 1 mg/kg de droga, sendo subdividido em grupos de droga, recebendo sildenafil ou análogos uréia ou uretana ou carbonato de lodenafil (n=3 para cada droga).

O grupo de administração oral, recebendo 10 mg/kg de droga, sendo subdivididos em grupos de droga que receberam sildenafil ou análogo carbonato de lodenafil (n=3 para cada droga).

O período de intervalo entre uma droga e outra não foi menor que 7 dias. As drogas foram dissolvidas imediatamente antes da administração endovenosa em DMSO 80%. E para administração oral os compostos foram envasados em cápsula de gelatina.

As coletas de sangue subseqüentes (~3 ml), ocorreram obedecendo aos seguintes tempos de coleta: 0:05, 0:15, 0:30, 0:60, 1:30, 2:00, 3:00, 4:00, 6:00, 8:00, 10:00 e 12:00 h (e 24:00 h para v.o.). Ao final de cada coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 *g* por 10 min para obtenção de plasma. O plasma obtido foi mantido congelado a –20 ^{o}C, para análise em HPLC-MS/MS.

2.5.3- Condições cromatográficas e espectrometria de massa

O método analítico aplicado na avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico. Não há um consenso quanto ao melhor método, porém a combinação da HPLC acoplada à espectrometria de massa mostra-se de grande valor na analise de fármacos e seus metabólitos, substâncias endógenas polares e macromoleculares (Li et al., 1996).

Os compostos sildenafil, análogo carbonato, análogo uretana, lodenafil e desmetil sildenafil, assim como o padrão interno teofilina, foram extraídos de plasma de beagle utilizando-se a metodologia de extração líquido-líquido. As amostras de plasma de beagle (200 μl) foram contaminadas com padrão interno (50 μl de uma solução de teofilina em metanol/água 50/50 v/v contendo 1,0 μg/ml). Após agitação com vortex por 10 segundos, 4 ml de uma mistura éter etílico/hexano (80/20 v/v) foram adicionados e os tubos agitados com vórtex por 40 segundos. A camada orgânica foi transferida para outro tubo de ensaio e secada sob N_2 a 37 ^{o}C. O resíduo foi dissolvido em fase móvel (200 μl), agitados com vórtex por 10 s e 10 μl injetados no cromatógrafo. A fase móvel foi composta por acetonitrila/água (80/20 v/v) e ácido fórmico (10 mM). A coluna cromatográfica utilizada foi Genesis C18 4,0 μm (150 mm x 4,6 mm i.d.) a um fluxo de fase móvel de 0,5 ml/min. O sistema HPLC-MS/MS consistiu de um cromatógrafo liquido LC-10AVP (Shimadzu - Japão) com bomba binária, desgasificador Agilent modelo G1322-A, auto-injetor CTC *analytics model HTS Pal*, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo API-2000 (*Applied Biosystems Sciex Foster city*, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray modo positivo. A integração foi realizada usando o software *Masslynx* version 3,5 (Micromass, UK). As massas dos íons monitorados foram MRM de 475>100, 505>99, 518>244, 991>486 e 461>283 para o sildenafil, lodenafil, análogo carbonato de lodenafil, análogo uretana e desmetil sildenafil, nesta ordem, e MRM de 181>124 para o padrão interno.

O tempo de retenção destes compostos foi para o analito sildenafil, 3,4 min, desmetil sildenafil, 3,4 min, lodenafil, 3,4 min, análogo uretana, 4,2 min e análogo carbonato de lodenafil, 4,2 min e padrão interno, teofilina, 4,1 min. O tempo total de

corrida foi de 6,0 min. A curva de calibração foi linear para as concentrações de 10–2000 ng/ml para os compostos com um coeficiente de correlação de 1,0 (sildenafil), 0,986 (desmetil sildenafil), 0,991 (lodenafil), 0,982 (análogo carbonato de lodenafil) e 0,989 (análogo uretana). O limite de quantificação do método foi 10 ng/ml (S/N=5) para os compostos em estudos.

2.5.4- Obtenção dos parâmetros farmacocinéticos

Os logaritmos das concentrações plasmáticas de sildenafil e análogos de sildenafil foram traçados graficamente como uma função de tempo.

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram obtidos: a área sob a curva de concentração sanguínea *versus* tempo, do tempo zero ao tempo 24 h, ($ASC_{0\text{-}24h}$) foi calculada através do método da regra trapezoidal. A concentração plasmática inicial (C_0) foi obtida pela extrapolação ao tempo zero desde a fase terminal da eliminação.

A constante de eliminação (Ke) foi estimada pela regressão linear e o tempo de meia-vida ($T_{½}$) foi obtido usando a equação $T_{½}= 0{,}693.Ke^{-1}$. O volume de distribuição (Vd) foi calculado através da razão da dose administrada pela concentração plasmática do fármaco ao tempo zero (C_0). O software usado foi o WinNonlin Professional Network, versão 3,2m, GraphPad Prism version 3,0 e WinStat version 3,1.

2.6- Análise estatística

Os resultados dos testes de atividade enzimática e agregação plaquetária foram expressos como média ± desvio padrão de n experimentos. Diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. Valores de $P< 0{,}05$ foram considerados significativos.

3- RESULTADOS

3.1- Resultados da padronização do método de dosagem de nucleotídeos

Os nucleotídeos cíclicos são caracterízados pela presença da ligação 3`,5`-fosfodiéster no anel β-d-ribofuranosil. Alguns nucleotídeos têm características básicas fracas em seu anel heterocíclico (anel purina ou pirimidina); entretanto o grupo fosfato nos nucleotídeos concede também características ácidas à molécula. Deste modo eles podem atuar como zwitterions, podendo ser ionizados com ES positivo ou negativo para sua análise em MS. Nas condições de análise utilizada para este método, a ionização por ES positivo foi mais sensível para os nucleotídeos cíclicos e não cíclicos quando comparada ao modo negativo. Os valores obtidos para a ionização dos nucleotídeos no espectrômetro de massa em modo positivo estão demonstrados na Tabela 5.

Os espectros de massa obtidos das moléculas de GMPc, GMP, AMPc e AMP e seus respectivos fragmentos (íon produto) em modo MRM, estão representados na Figura 2, 3, 4 e 5.

Os cromatogramas HPLC-MS/MS dos quatro nucleotídeos mostraram que a separação cromatográfica não era um parâmetro crítico neste método, devido à possibilidade de detectar os quatro nucleotídeos ainda que estes demonstrassem o mesmo tempo de retenção cromatográfico (Figuras 6 e 7).

Tabela 5- Parâmetros otimizados da Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Cela de Colisão (CXP), para as transições monitoradas em modo MRM dos nucleotídeos

Compostos	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	CXP (V)	CE (eV)
AMP	348.10	136.30	24	27
AMPc	330.10	136.30	24	33
GMP	364.10	152.10	28	21
GMPc	346.30	152.10	12	27

Neste método a curva de calibração foi linear com coeficiente de correlação de 0,999 para GMPc e AMP, e 0,997 para GMP e AMPc, mostrando boa linearidade no método (Figura 8). O limite de quantificação do método para os nucleotídeos foi de 0,25ng/ml, com S/N= 25,3 para AMP, S/N= 20,6 para AMPc, S/N= 21,8 para GMPc e S/N= 14,4 para GMP (Figura 6). Neste método os valores de S/N eram altos, podendo otimizar o método, conseguindo um LQ menor, para a quantificação destes nucleotídeos. Os valores de acurácia entre 70 – 130% e o coeficiente de variabilidade (CV) < 20% eram obtidos para todos os nucleotídeos em análise (Tabela 6), indicando que o método é reprodutivo de acordo com guia internacional de padronização de métodos analíticos (*European Commission Council Decision,* 2002)

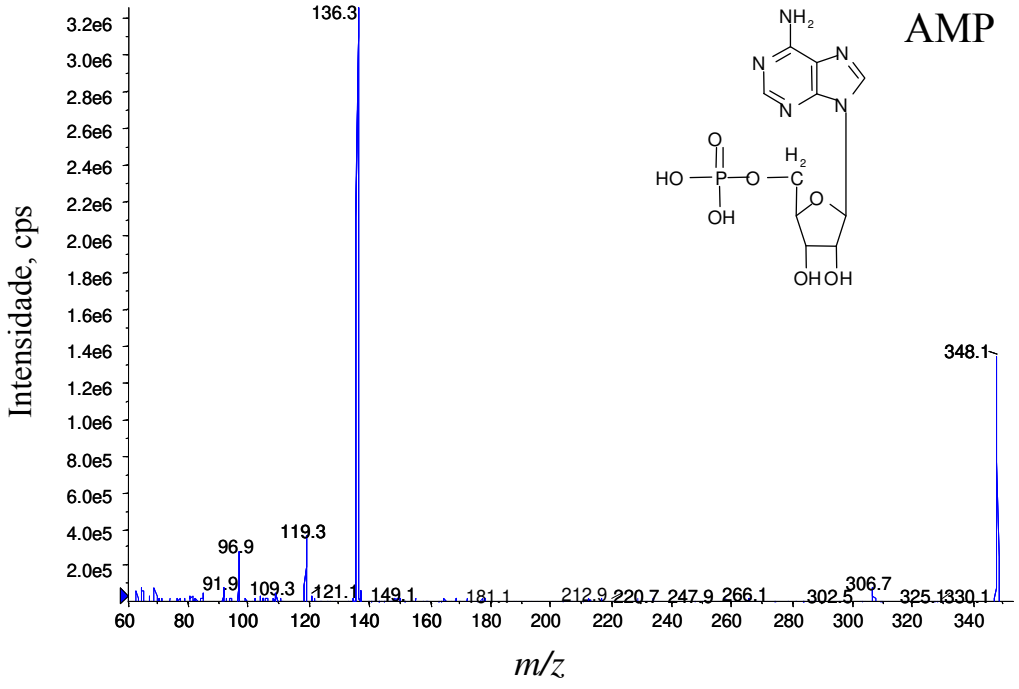


Figura 2- Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de AMP m/z 348.1 (fragmento m/z 136.3)

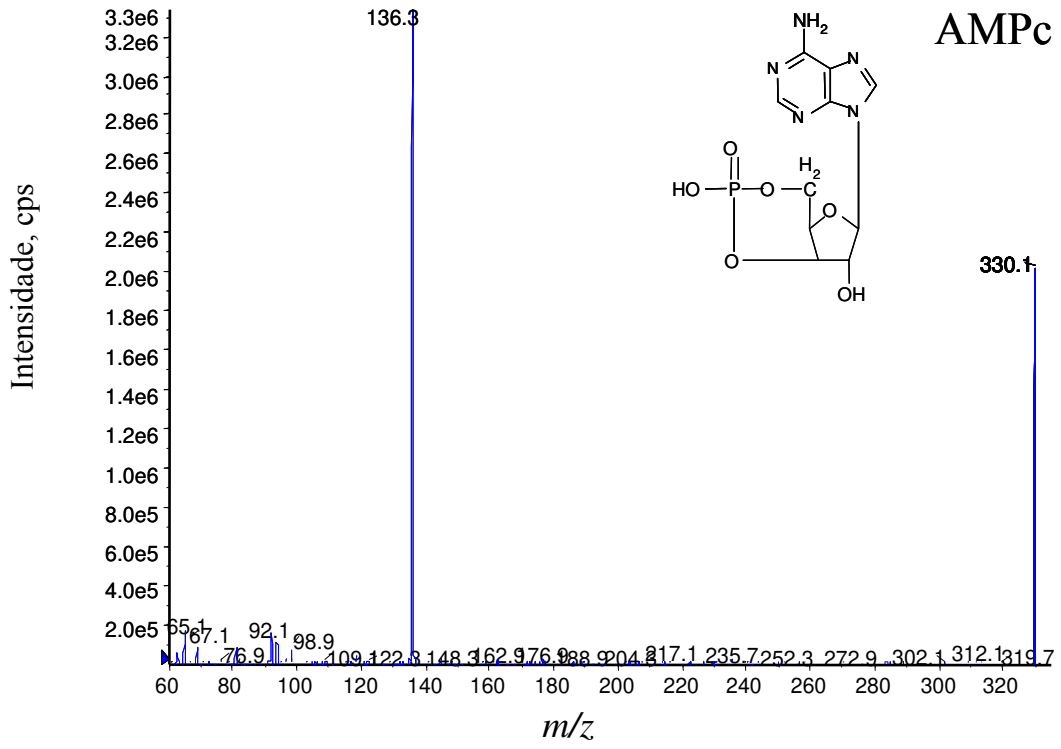


Figura 3- Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de AMPc m/z 330.1 (fragmento m/z 136.3)

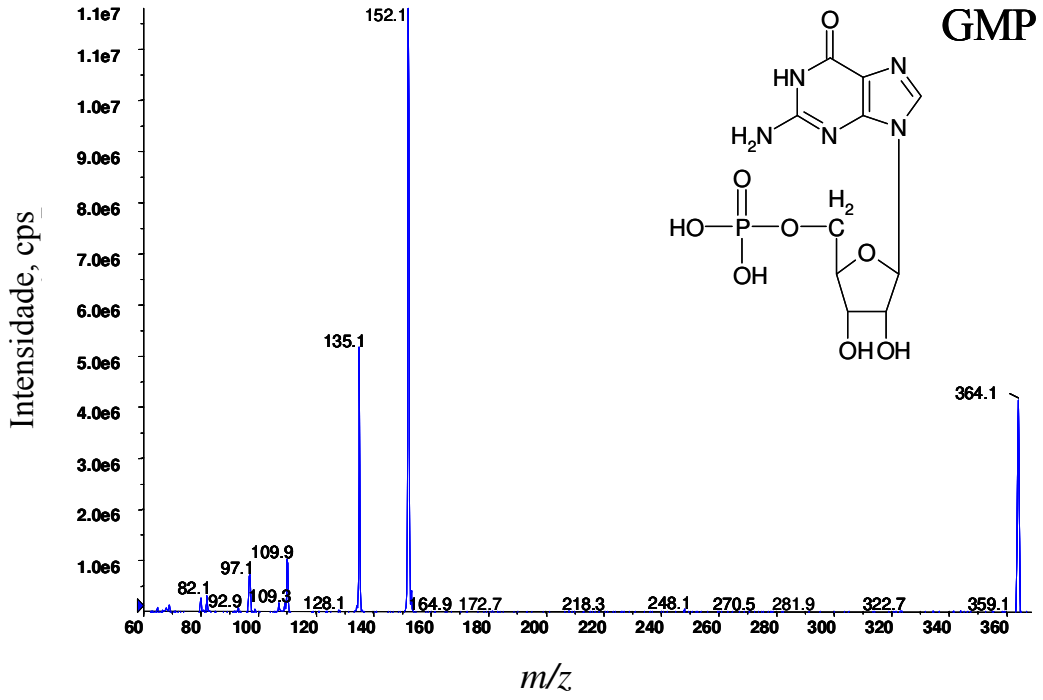


Figura 4- Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de GMP m/z 364.1 (fragmento m/z 152.1)

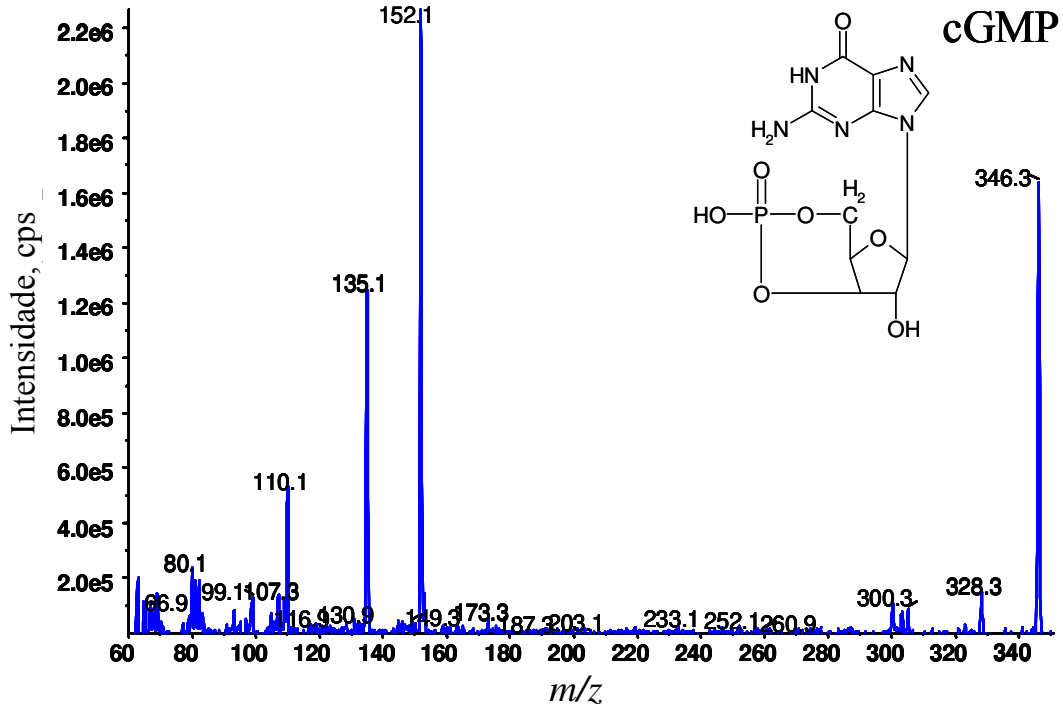


Figura 5- Espectro de massa dos principais fragmentos obtidos por MRM das moléculas de GMPc m/z 346.3 (fragmento m/z 152.1)

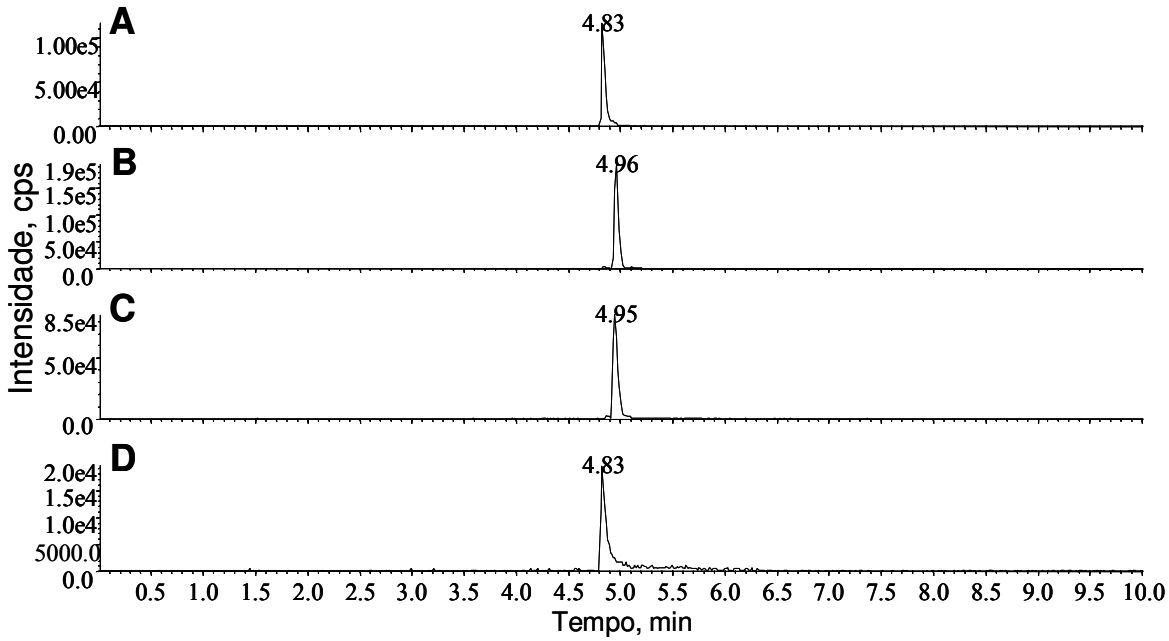


Figura 6- Cromatograma HPLC-MS/MS dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos, na concentração de 10,0ng/ml. Cada cromatograma apresenta separadamente os nucleotídeos, (A) AMP, (B) cAMP, (C) cGMP e (D) GMP

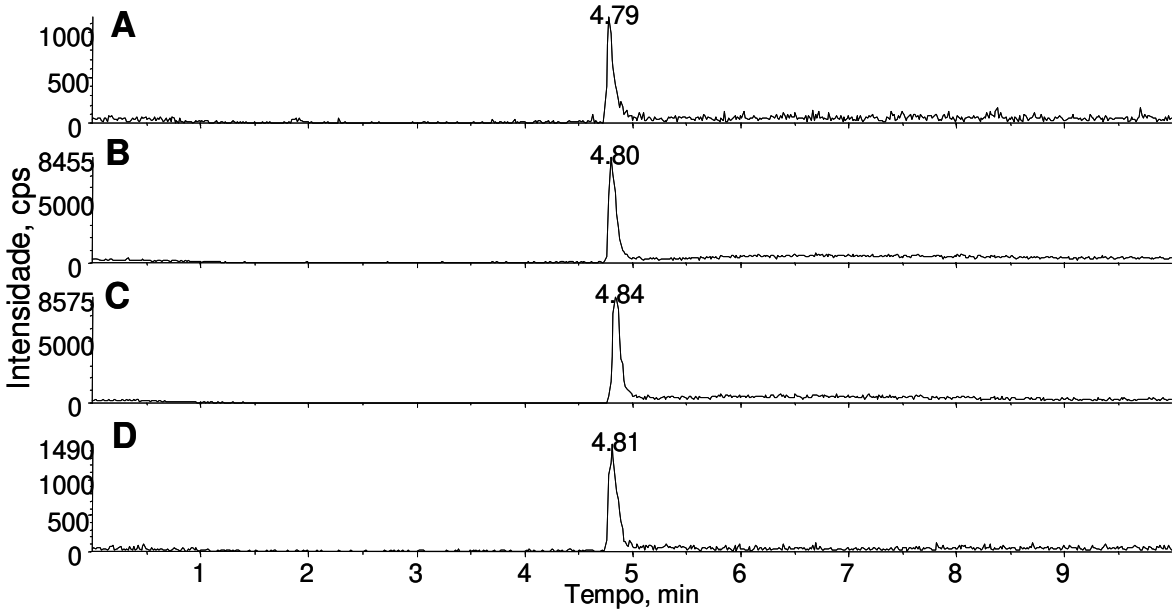


Figura 7- Cromatograma HPLC-MS/MS dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos, na concentração de 0,25 ng/ml. Cada cromatograma apresenta separadamente os nucleotídeos, (A) AMP, (B) cAMP, (C) cGMP e (D) GMP

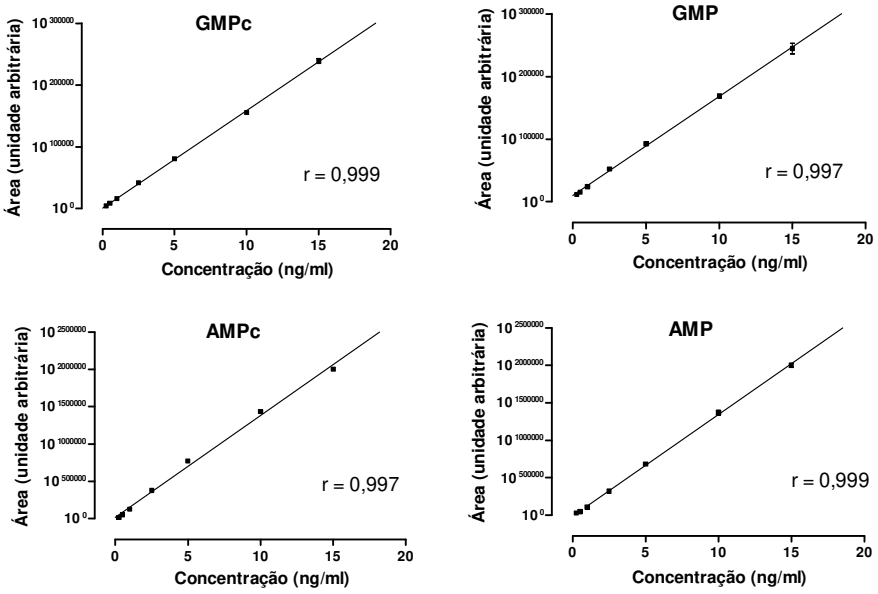


Figura 8- Curva de calibração dos padrões de nucleotídeos

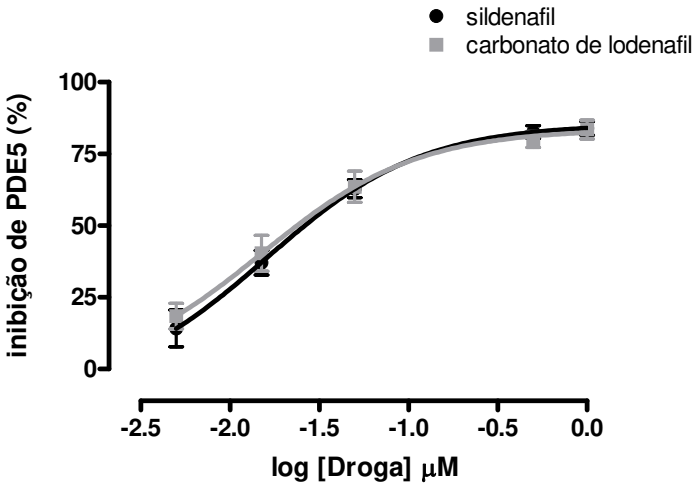
Tabela 6- Validação do método para nucleotídeos

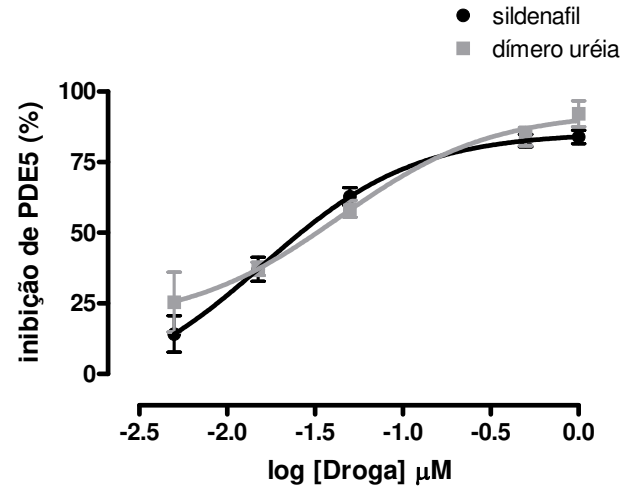
0,25ng/mL (concentração padrão)	**Média**	**Desvio Padrão**	**Acurácia (%)**	**Coeficiente de variação (%)**
GMPc	0,251	0,012	100,333	4,673
AMPc	0,252	0,007	100,600	2,783
GMP	0,258	0,013	103,000	4,854
AMP	0,256	0,012	102,400	4,492
0,5ng/mL (concentração padrão)	**Média**	**Desvio Padrão**	**Acurácia (%)**	**Coeficiente de variação (%)**
GMPc	0,506	0,017	101,160	3,274
AMPc	0,503	0,034	100,543	6,771
GMP	0,479	0,042	95,867	8,716
AMP	0,510	0,035	102,067	6,836

3.2- Atividade inibitória

3.2.1- Inibição de PDE5 *in vitro*

A adição de concentrações crescentes do inibidor de PDE5, sildenafil (0,005-1,0μM) na reação enzimática, promoveu alta redução da hidrólise de GMPc, concentração–dependente. Os resultados demonstraram que os análogos de sildenafil inibiam a atividade de PDE5 não significativamente quando comparados ao sildenafil ($p<0,05$) (Figura 9). Quando comparados entre os grupos de análogos, também não foi observada diferença na inibição da PDE5 plaquetária.





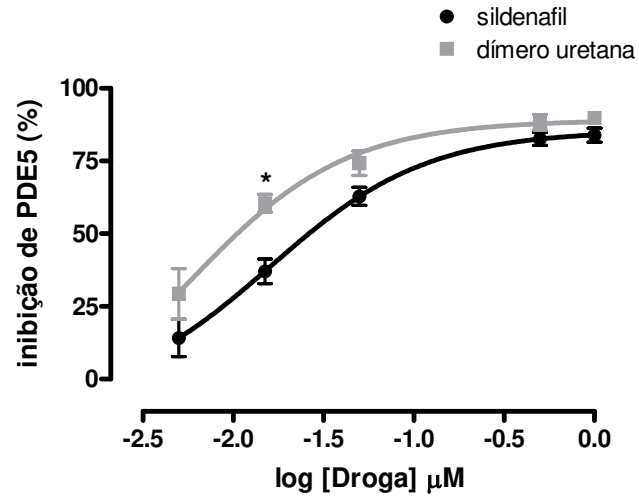


Figura 9- Efeito da inibição de PDE5 plaquetária, por sildenafil e análogos de sildenafil, *in vitro*. Os resultados representam a média (% de inibição) ±D.P., n=4, *p< 0.05

3.2.2- Agregação plaquetária

No experimento de agregação plaquetária, a pré-incubação com sildenafil (1,0μM) por 2 min aumentou significativamente os efeitos inibitórios de SNP, nas concentrações 0,3μM e 1,0μM, utilizando ADP, como agonista (Figura 11). Entretanto nenhuma inibição foi observada na concentração de 1,0 μM de sildenafil na agregação de plaquetas humanas, na ausência de SNP. Foi demonstrada uma curva dose-resposta para as concentrações de SNP, na agregação plaquetária.

Todos os análogos de sildenafil (carbonato de lodenafil, uréia e uretana), sozinhos, não conseguiam inibir a agregação das plaquetas em PRP induzida por ADP. O mesmo resultado observado e esperado por sildenafil. Entretanto, em adição com SNP, potencializavam a ação inibitória do NO, na agregação, na concentração de 0,3μM de SNP, aumentando significativamente esta inibição ($p<0,001$) (Figura 10).

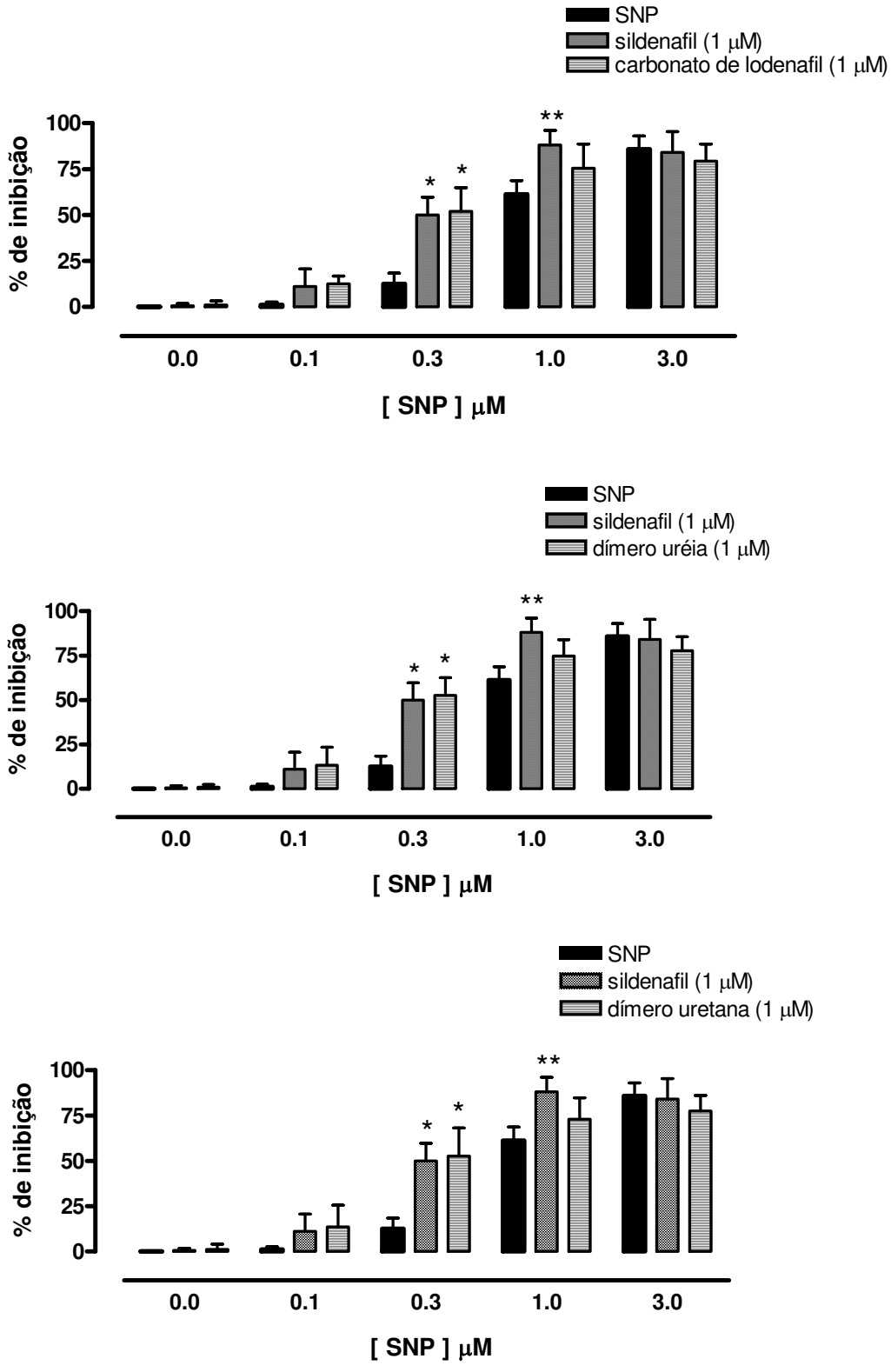


Figura 10- Efeito da agregação plaquetária induzida por ADP. Os resultados representam a média (% de inibição) ±DP, n=5. *P<0,001, **p<0,01, comparado com o grupo SNP

3.3- Estudo de estabilidade

3.3.1- Estabilidade em meio ácido

A hidrólise de sildenafil e análogos foi monitorada em solução aquosa a 37°C em pH ácido. Os resultados demonstraram que o sildenafil e análogos exibem alta estabilidade aquosa em pH ácido, quando comparadas as alturas dos picos cromatográficos, após 2 h de incubação. No cromatograma do carbonato de lodenafil, é observado um pequeno pico cromatográfico para lodenafil no tempo de 2,48 min (Figura 11). Entretanto a altura do pico cromatográfico do análogo carbonato (7,45 min) não reduziu significativamente, quando comparado ao tempo zero. Nenhum pico adicional foi observado quando sildenafil, lodenafil e desmetil sildenafil foram incubados em meio ácido.

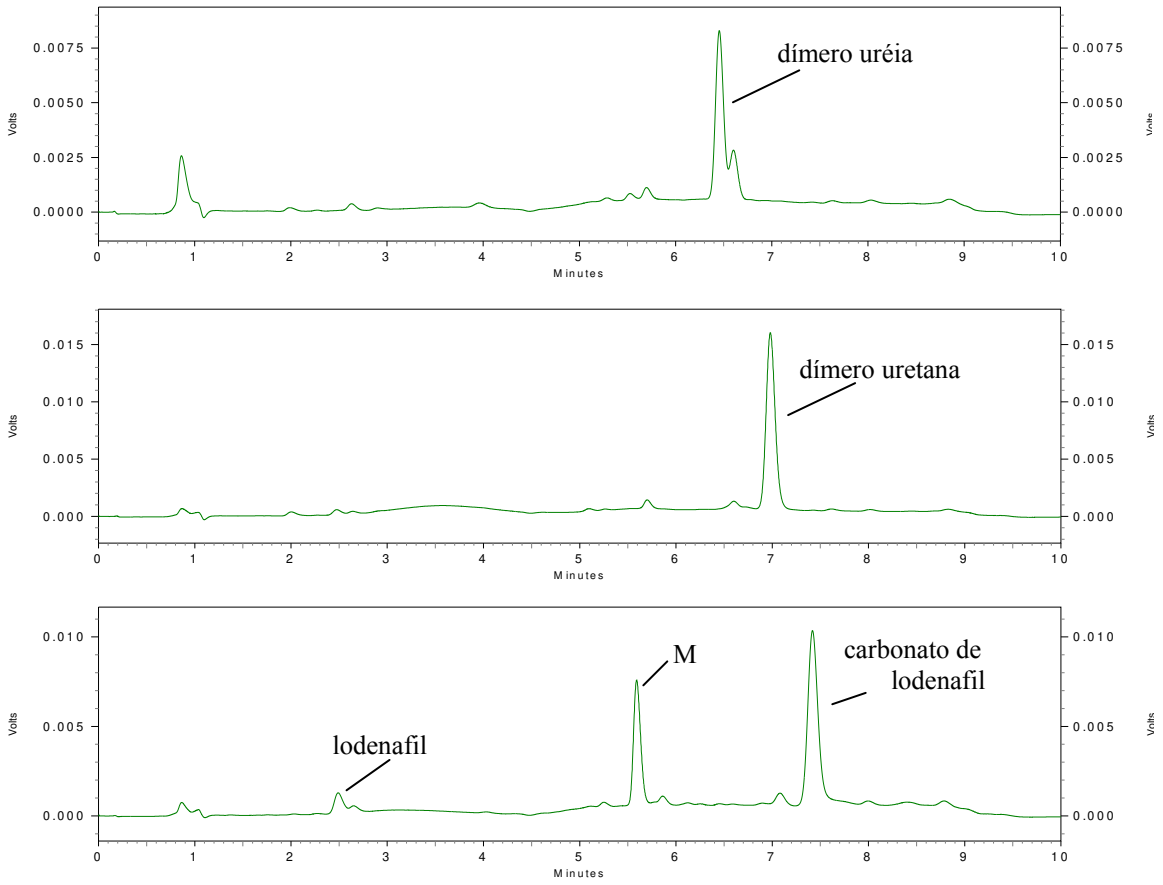


Figura 11- Cromatograma (HPLC-UV) dos análogos uréia, uretana e carbonato de lodenafil após 2 h de incubação em meio ácido

3.3.2- Estabilidade em plasma humano

A hidrólise de sildenafil e análogos foi monitorada em plasma humano a 37°C. Os resultados demonstraram que o sildenafil e análogos uréia e uretana exibem alta estabilidade em plasma humano, quando comparadas as alturas dos picos cromatográficos, após 2 h de incubação. Para o carbonato de lodenafil, é observado pico cromatográfico para lodenafil no tempo de 2,48 min (Figura 12) após 2 h de incubação com plasma humano, entretanto a altura do pico cromatográfico do carbonato de lodenafil (7,45 min) não reduziu significativamente, quando comparado ao tempo zero. Nenhum pico adicional foi observado quando sildenafil, lodenafil e desmetil sildenafil foram incubados em plasma humano.

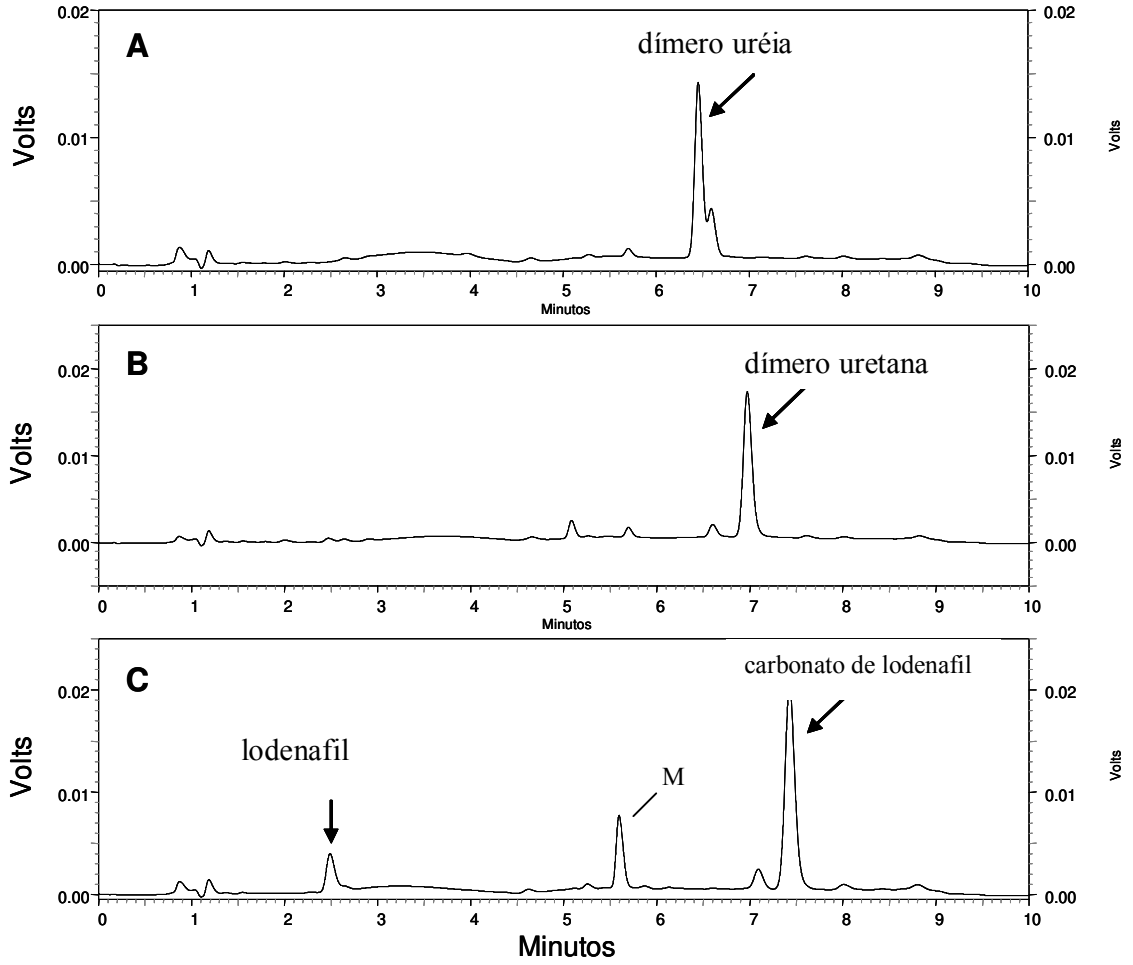


Figura 12- Cromatograma (HPLC-UV) dos análogos uréia (**A**), uretana (**B**) e carbonato de lodenafil (**C**) após 2 h de incubação em plasma humano

3.4- Metabolismo *in vitro*

3.4.1- Microssomas

Como reportado na literatura, sildenafil era desmetilado para a forma de desmetil sildenafil (UK-103,320) durante incubação com microssomas de fígado de rato (Walker et al., 1999). Os resultados do presente trabalho demonstrou que sildenafil era metabolizado principalmente em desmetil sildenafil, *in vitro*. O perfil cromatográfico da metabolização de sildenafil pelos microssomas de rato foi observado, conforme demonstrado na Figura 13. Para o análogo uréia e uretana, não foi observado a metabolização deste pelos microssomas, após 30 min de incubação, não diminuindo significativamente a altura do pico cromatográfico destes compostos (Figura 14). Para o carbonato de lodenafil foram observados picos cromatográficos como possíveis metabólitos lodenafil e desmetil sildenafil.

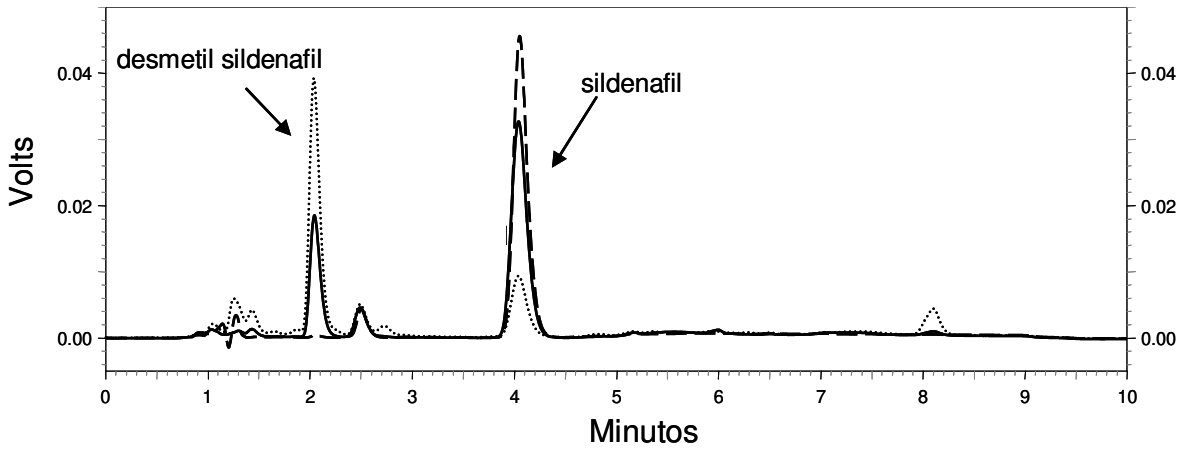


Figura 13- Perfil cromatográfico da metabolização de sildenafil nos tempo de 0 min (- - -), 5 min (——) e 30 min (·····) de incubação com microssomas de rato

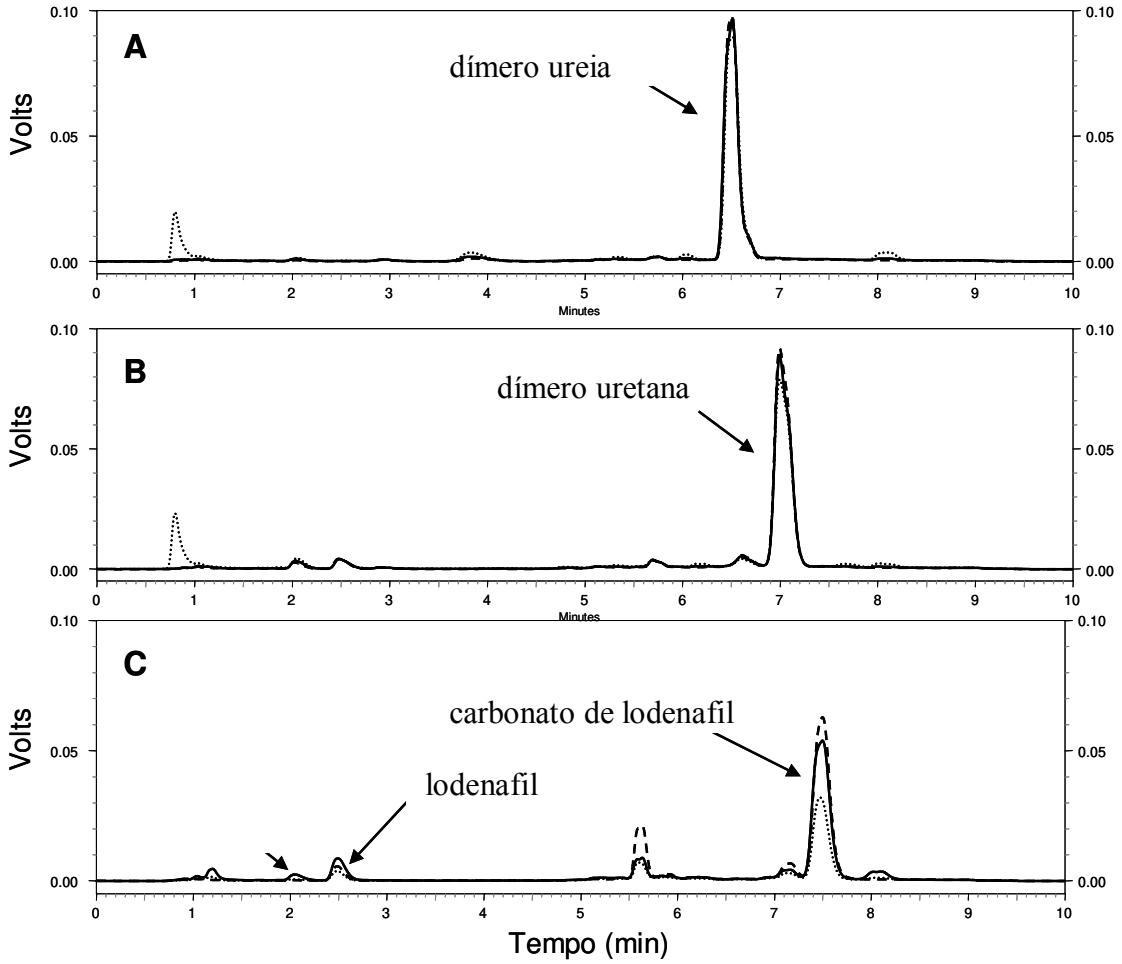


Figura 14- Perfil cromatográfico da metabolização dos análogos uréia (**A**), uretana (**B**) e carbonato de lodenafil (**C**) nos tempo de 0 min (- - -), 5 min (——) e 30 min (·····) de incubação com microssomas de rato

3.4.2- Hepatócitos

O perfil cromatográfico da metabolização de sildenafil pelos hepatócitos de rato foi observado (Figura 15), o qual demonstrou grande parte da metabolização para desmetil sildenafil. Entretanto para o carbonato de lodenafil, este era hidrolisado em mais de 50% em loenafil durante incubação de 2 h com hepatócitos de rato.

Uma pequena quantidade de lodenafil e desmetil sildenafil foram detectadas após incubação do análogo uretana com hepatócitos. Para o análogo uréia não foi detectado metabólitos (lodenafil ou desmetil sildenafil) (Figura 16).

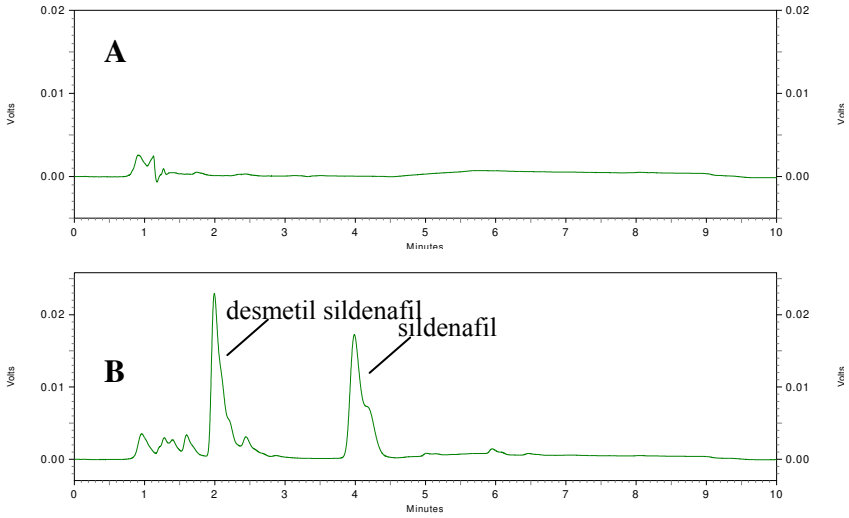


Figura 15- Cromatograma (HPLC-UV) da incubação com hepatócitos de ratos de amostra branco (**A**) e sildenafil (**B**), indicando os metabólitos formados após 30 min de incubação

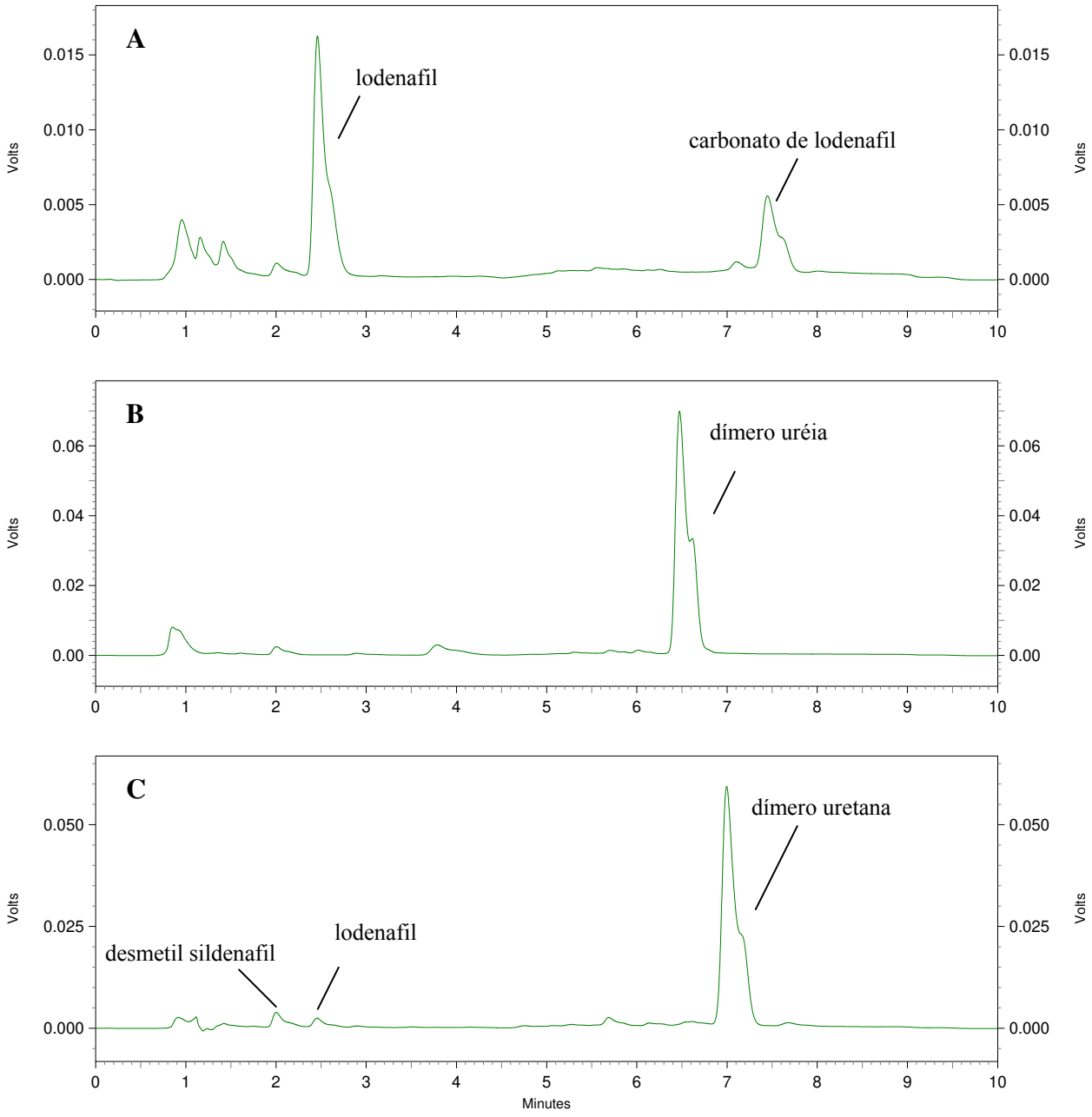


Figura 16- Cromatograma (HPLC-UV) da incubação com hepatócitos de ratos de amostra carbonato de lodeanfil (**A**), análogo uréia (**B**) e análogo uretana (**C**), indicando os metabólitos formados após 30 min de incubação

3.5- Avaliação farmacocinética

3.5.1- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil

O traçado da curva concentração-tempo do plasma de cães e os parâmetros farmacocinéticos do sildenafil (1 mg/kg, i.v.) estão representados na Figura 17 e na Tabela 7. Os valores de desmetil sildenafil (principal metabólito) no grupo sildenafil não foram demonstrados, visto que todos os valores foram encontrados abaixo do limite de quantificação.

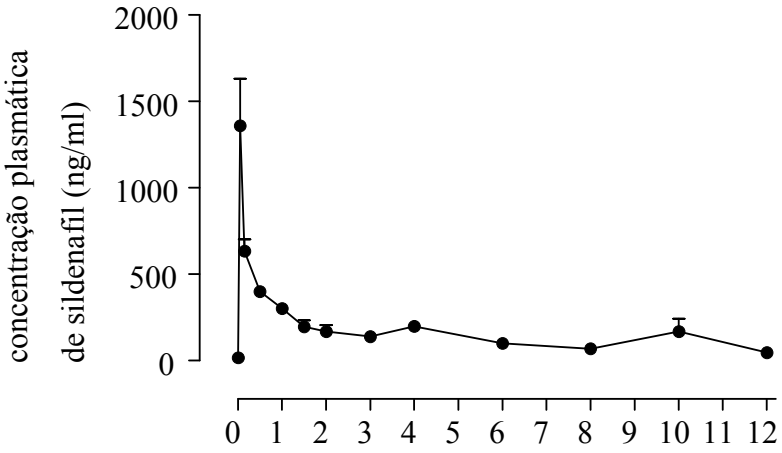


Figura 17- Curva concentração-tempo da média da concentração do sildenafil (●) em plasma de cão do grupo sildenafil (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Tabela 7- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu sildenafil (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

sildenafil	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_o (ng/ml)	1360,00 ± 395,00
$ASC_{0\text{-}12h}$ ng h/ml	2080,00 ± 464,00
$T_{1/2}$ (h)	4,48 ± 1,40
Vd (l/Kg)	2,66 ± 0,01
Cl (l/h/Kg)	0,44 ± 0,14
Ke (1/h)	0,17 ± 0,05

3.5.2- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil

O traçado da curva concentração-tempo do plasma de cães e os parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil (1mg/kg, i.v.) estão representados na Figura 18 e na Tabela 8. Foram demonstrados os valores dos principais metabólitos, lodenafil e desmetil sildenafil no grupo que recebeu carbonato de lodenafil.

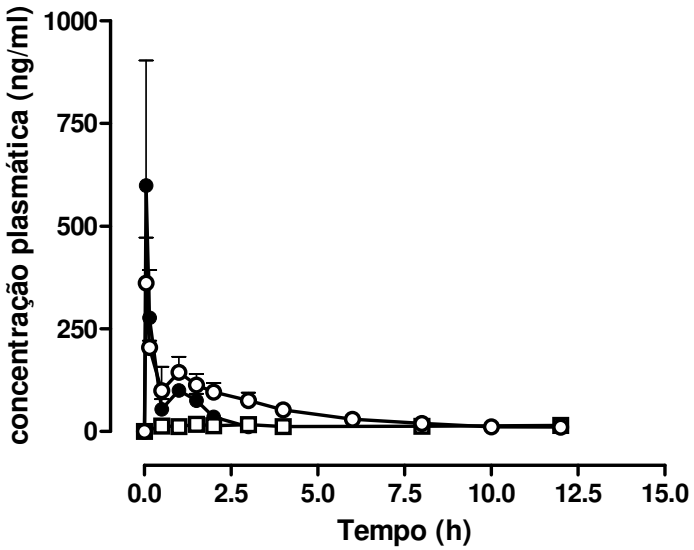


Figura 18- Curva concentração-tempo da média da concentração do carbonato de lodenafil (●), lodenafil(○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo carbonato de lodenafil(1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Tabela 8- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafill (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

carbonato de lodenafil	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_o (ng/ml)	583,19 ± 446,93
$ASC_{0\text{-}12h}$ ng h/ml	267,44 ± 50,26
$T_{1/2}$ (h)	0,59 ± 0,27
Vd (l/Kg)	2,39 ± 1,38
Cl (l/h/Kg)	3,82 ± 0,67
Ke (1/h)	1,52 ± 1,00

3.5.3- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do análogo uretana

O traçado da curva concentração-tempo do plasma de cães e os parâmetros farmacocinéticos do análogo uretana (1 mg/kg, i.v.) estão representados na Figura 19 e na Tabela 9. Foram demonstrados os valores dos principais metabólitos, lodenafil e desmetil sildenafil no grupo que recebeu análogo uretana.

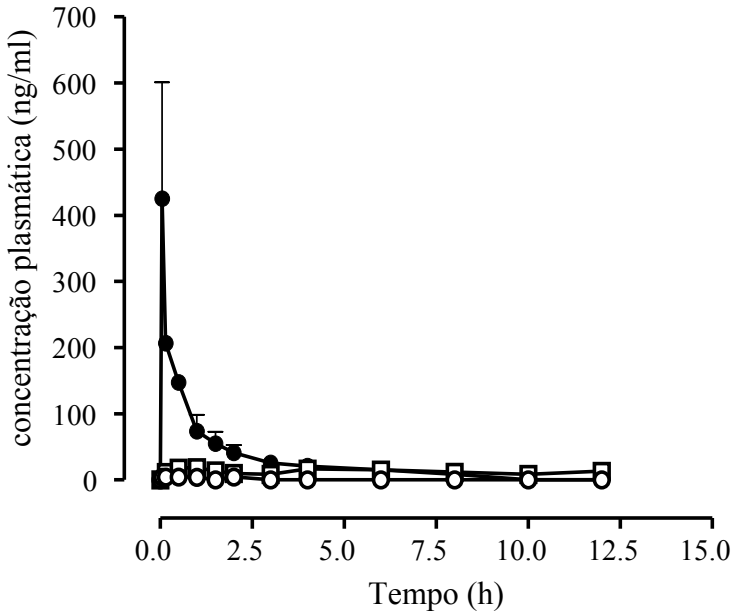


Figura 19- Curva concentração-tempo da média da concentração do analito análogo uretana (●), lodenafil (○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo análogo uretana (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Tabela 9- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do analito análogo uretana analisada em plasma de cão do grupo que recebeu análogo uretana (1mg/kg, i.v., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

dímero uretana	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_o (ng/ml)	655,27 ± 653,77
$ASC_{0\text{-}12h}$ ng h/ml	366,03 ± 133,62
$T_{1/2}$ (h)	4,82 ± 1,18
Vd (l/Kg)	0,02 ± 0,01
Cl (l/h/Kg)	0,002 ± 0,001
Ke (1/h)	0,15 ± 0,04

3.5.4- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil, v.o.

O traçado da curva concentração-tempo do plasma de cães e os parâmetros farmacocinéticos do sildenafil (10 mg/kg, v.o.) estão representados na Figura 20 e na Tabela 10. Foram demonstrados os valores dos principais metabólitos, desmetil sildenafil no grupo que recebeu sildenafil.

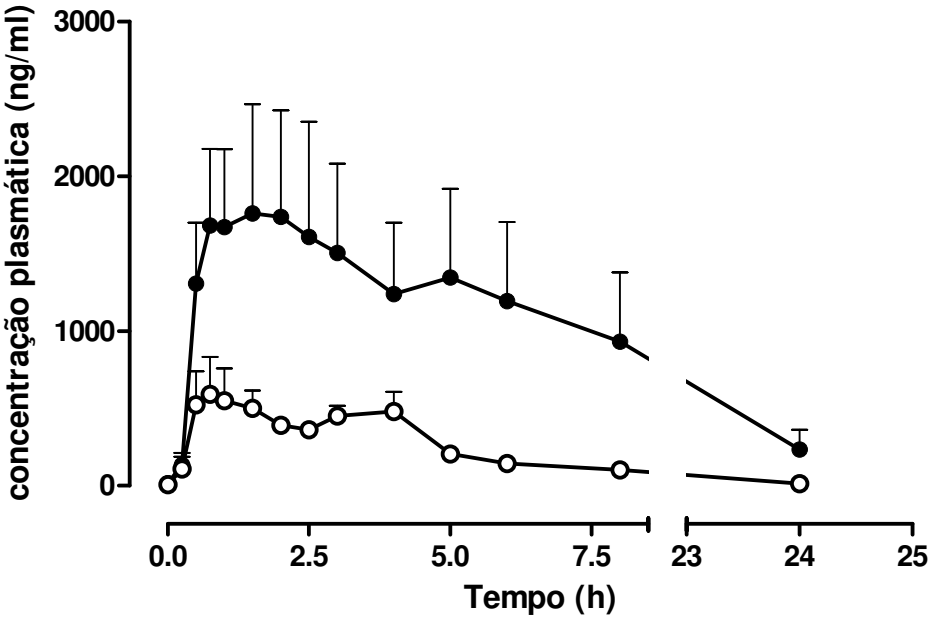


Figura 20- Curva concentração-tempo da média da concentração do sildenafil (●) e desmetil sildenafil (○) em plasma de cão do grupo sildenafil (10 mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Tabela 10- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do sildenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu sildenafil (10 mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

sildenafil	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_{max} (ng/ml)	2056,00 ± 951,00
$ASC_{0\text{-}24h}$ ng h/ml	19721,00 ± 15074,00
$T_{1/2}$ (h)	7,08 ± 1,40
T_{max} (h)	2,00 ± 0,63
Ke (1/h)	0,10 ± 1,00

3.5.5- Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil, V.O.

O traçado da curva concentração-tempo do plasma de cães e os parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil (10 mg/kg, v.o.) estão representados na Figura 21 e na Tabela 11 e 12. Foram demonstrados os valores dos principais metabólitos, lodenafil no grupo que recebeu carbonato de lodenafil.

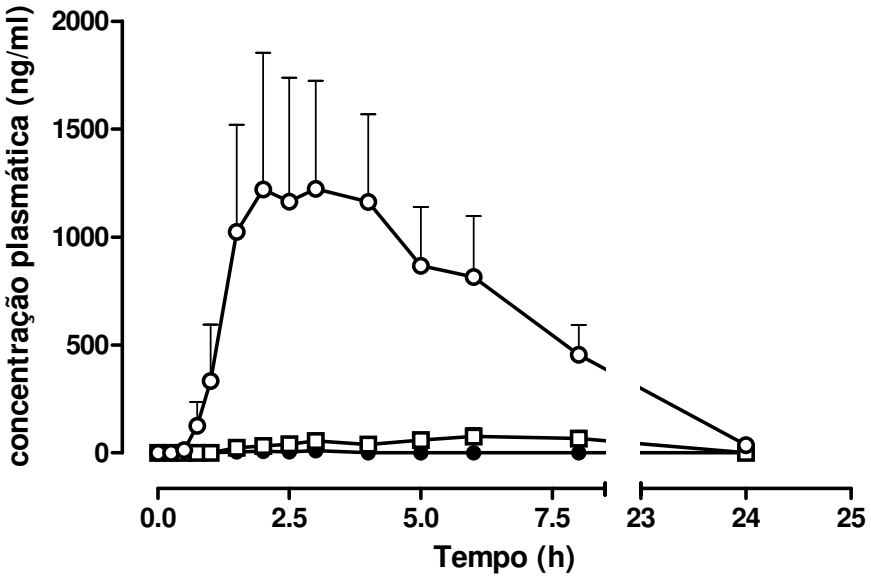


Figura 21- Curva concentração-tempo da média da concentração do carbonato de lodenafil (●), lodenafil (○) e desmetil sildenafil (□) em plasma de cão do grupo carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Tabela 11- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do carbonato de lodenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

Carbonato de lodenafil	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_{max} (ng/ml)	16,50 ± 14,85
ASC_{0-24h} ng h/ml	35,00 ± 9,55
$T_{1/2}$ (h)	2,11 ± 3,00
T_{max} (h)	1,67± 1,53
Ke (1/h)	1,50 ± 0,98

Tabela 12- Valores dos parâmetros farmacocinéticos do lodenafil analisado em plasma de cão do grupo que recebeu carbonato de lodenafil (10mg/kg, v.o., n=3). Os valores são expressos em média ± DP

lodenafil	
Parâmetros	**Média ± DP**
C_{max} (ng/ml)	1357,00 ± 961,16
ASC_{0-24h} ng h/ml	10422,83 ± 6290,09
$T_{1/2}$ (h)	4,23 ± 0,47
T_{max} (h)	3,33 ± 1,15
Ke (1/h)	0,17 ± 0,02

4- DISCUSSÃO

Nucleotídeos cíclicos são considerados segundos mensageiros com um significativo papel regulatório nos processos biológicos. A identificação e quantificação destes nucleotídeos tem sido estudada, desde 1962, pela identificação de AMPc por Sutherland *et al.* (Butcher e Sutherland, 1962). O interesse neste tipo de análise possibilita a identificação de atividades inibitórias ou estimulatórias nos processos fisiológicos. Por exemplo, o aumento nos níveis de GMPc por inibidores da atividade de PDEs (exemplo, o sildenafil).

Nos métodos já registrados para analisar a atividade de PDEs pela quantificação de seu substrato ou produto, foram usados isótopos radioativos, substrato fluorogênico (Hiratsuka 1982; Alajoutsijarvi e Nissinen 1987; Johnson et al. 1987; Schilling et al. 1994), ou reativo fluorescente para sistema HPLC (Ohba et al. 2001). Estes métodos além de exigir um reagente de ligação, necessitam de um longo período de análise. No presente trabalho, o método desenvolvido pelo sistema HPLC-MS/MS, demonstrou ser seletivo e altamente sensível para quantificação dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos. Não foi utilizado para o sistema cromatográfico de fase reversa, um reagente de pareamento iônico, como dimetilhexilamina (DMHA), minimizando assim, a poluição da fonte no espectrômetro (Niessen e Tinke, 1995; Witters et al., 1997). Embora trabalhos mais recentes de simultânea análise para nucleotídeos (AMP, ADP e ATP), extraídos de célula de glioma C6 (Quian et al., 2004), tenham demonstrado maior sensibilidade com DMHA em sistema ES-MS, em modo íon positivo.

A grande vantagem deste método em relação aos métodos já publicados na literatura para identificação de nucleotídeos, baseia-se no monitoramento dos nucleotídeos cíclicos e não cíclicos ligados a atividade de PDEs, conseguindo obter na atividade enzimática, a identificação e quantificação do substrato e formação do produto, simultaneamente. Além de, apresentar análise rápida, sensível e de alta reprodutividade, confirmado pelos valores de acurácia (70-130%) e coeficiente da variabilidade (<20%) (European Commission Council Decision, 2002). Era também comprovada a eficácia deste método, na análise da atividade de PDEs *in vitro*, com drogas inibidoras de PDE5, como sildenafil.

No presente trabalho, também foi estudada a síntese de novos compostos análogos de sildenafil, representando uma nova alternativa para o tratamento da DE, uma patologia relevante, considerando que um em cada cinco homens já passaram por experiência de disfunção erétil e sua incidência está correlacionada com a idade (Braun et al. 2000; Gresser e Gleiter 2002). Para o estudo destes novos fármacos, se faz necessária a compreensão do mecanismo de ação, de seus efeitos e de suas propriedades farmacocinéticas.

Na década de 80, era conhecido o potencial inibitório do grupo pirazolopirimidina na PDE5, pela possibilidade estrutural deste simular a base de purina do GMPc na ligação com a PDE5 (Ghofrani et al., 2006). Este foi o primeiro passo para a síntese de sildenafil, que vem sendo cada vez mais modificado estruturalmente (Kim et al., 2001a e 2001b; Allerton et al., 2006, Wang et al., 2007) visando prolongar seus efeitos no tratamento de DE, diminuir seus efeitos colaterais, tornando a droga mais seletiva para PDE5, além de produzir uma droga concorrente ao sildenafil no mercado mundial, principalmente pelo fator econômico desta droga, sendo relatada em 2005 como a fármaco mais vendido no Brasil (IMS Health).

A avaliação da inibição de PDE5 de plaquetas humanas pelos análogos de sildenafil, *in vitro*, demonstrou que estas novas estruturas mantêm a inibição da PDE5, provavelmente pelo fato do grupo pirazolopirimidinona, responsável pelas ligações na PDE5 estar livre (Sung et al., 2003; Carson e Lue, 2005). Nesta análise era observado a hidrólise de GMPc por PDE5 e a inibição avaliada pela quantidade de GMP formado. A inibição de PDE5 foi concentração dependente das drogas na potencialização da inibição de SNP. Embora os análogos de sildenafil tenham apresentado potencial inibitório para PDE5, não foram demonstradas diferenças significativas na inibição de PDE5 quando comparados ao sildenafil. Também não foi observada diferença significativa quando comparados os resultados de inibição entre os análogos. Recentemente, as modificações na estrutura molecular do sildenafil nos grupos sulfonamida ou piperazino conservam a atividade inibitória na PDE5 das novas drogas (Kim et al., 2001c, Wang et al., 2007)

Outro método para avaliar a inibição da PDE5 pelos análogos de sildenafil é a inibição da agregação plaquetária. A PDE5 é expressa em plaquetas, além das PDE2 e 3 (Soderling e Beavo, 2000; Hidaka e Asano, 1976), e portanto não é surpreendente

que alguns casos de hemorragia prolongada tenham sido reportados em pacientes que usavam sildenafil (Sheikh et al., 2001; Tzathas et al., 2002). Estes achados clínicos são uma concordância com dados *in vitro* que demonstram efeito inibitório de sildenafil na agregação plaquetária (Halcox et al., 2002; Wallis et al., 1999), mas é importante considerar que os efeitos adversos clínicos reportados são raros. Entretanto, na literatura é questionado o efeito inibitório de sildenafil, sozinho, na agregação plaquetária.

Os resultados mostram que sildenafil não tem efeito direto, mas aumenta o efeito inibitório de um doador de NO na agregação plaquetária. Estes resultados estão de acordo com os resultados demonstrados por Wallis *et al.* (1999) e mais recentemente com um grupo maior de voluntários (n=25), apresentados por Gudmundsdóttir *et al.* (2005). O efeito inibitório de sildenafil na agregação plaquetária envolve o aumento dos níveis de GMPc. O oxido nítrico exógeno ativa GC a produzir GMPc, a formação de GMPc é mantida pela inibição de PDE5; níveis elevados de GMPc reduzem Ca^{+2} citosólico livre, por inibir o influxo e liberação de Ca^{+2} dos túbulos densos. Níveis baixos de Ca^{+2} não desencadeiam a exposição e ativação dos receptores de fibrinogênio IIb-IIIa para a agregação plaquetária (Folts et al., 1999). Embora as plaquetas sintetizem oxido nítrico constitutivo (Radomski et al., 1990a; Radomski et al., 1990b), esta síntese é dependente de Ca^{+2} intracelular, que no caso de plaquetas é somente elevado durante ativação, contudo níveis aumentados de GMPc por inibição de PDE5 seriam baixo como também tardios para ter impacto no processo de agregação (Gudmundsdóttir et al., 2005).

Na agregação plaquetária os análogos de sildenafil apresentou efeito semelhante à inibição de sildenafil. Não foi observada inibição da agregação plaquetária, quando as plaquetas eram incubadas com análogos de sildenafil, 3 min, antes da adição do agonista. Entretanto, os anpalogos também potencializavam a ação inibitória de SNP (doador de NO), na agregação plaquetária utilizando ADP como agonista. Nas concentrações de 0,3 µM sildenafil e análogos de sildenafil, potencializavam mais de 40% a inibição de SNP. Quando comparados os grupos, os análogos de sildenafil não apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) quando comparados ao sildenafil e entre eles, na inibição da agregação plaquetária. Esta atividade de potencializar a inibição de NO, na agregação, foi confirmada com resultados anteriores de inibição enzimática de PDE5 pelos análogos de sildenafil, *in vitro*.

Seguindo as formas de estudo para abordar um novo fármaco (Winter et al., 1994), a farmacocinética compreende várias etapas: a absorção, a distribuição, a metabolização e a eliminação de um fármaco. A avaliação da estabilidade das moléculas em meio ácido e plasma humano permitiu entender a eficiência da molécula nos modelos *in vitro*. Os presentes resultados demonstraram que os análogos foram estáveis em meio ácido e em plasma humano, assim como sildenafil.

Estudos *in vitro* utilizando microssomas de fígado humano demonstraram que 75% de sildenafil é biotransformado em desmetil sildenafil (UK-103,320), metabólito ativo, pelo CYP3A (Warrington et al., 2000). Uma pequena porcentagem de metabólito é formada em razão da atividade de CYP2C9 (20%), CYP2D6 e CYP2C19 (<2%, juntos) (Hyland et al., 2001). Warrington *et al.* (2002) demonstraram que microssomas de rato formavam metabólito desmetil sildenafil em altas concentrações, quando comparados aos microssomas humanos. Seus estudos utilizaram inibidores de anticorpos e inibidores de expressão de cDNA enzimático, identificando o papel do CYP2C11 como o principal responsável na formação de desmetil sildenafil em fígado de ratos, confirmando a metabolização de sildenafil para desmetil sildenafil, dos estudos *in vivo* com ratos e humanos (Walker et al., 1999). A diferença na biotransformação entre espécies pode ser atribuída, em parte, pela diferença na afinidade enzimática da via de metabolização. Outros estudos demonstram que substratos de CYP3A em humanos são comuns como substrato de CYP2C em ratos, como por exemplo, nifedipina e lidocaína (Smith, 1991).

Os resultados da metabolização de sildenafil em microssomas de rato *in vitro*, demonstraram desmetil sildenafil como principal metabólito de sildenafil, após 30 min de incubação com microssomas. Entretanto, para os análogos de sildenafil, não foram observados metabólitos no cromatograma HPLC-UV. É necessário um método mais específico para assegurar estes resultados, como por exemplo, técnica envolvendo HPLC e espectrometria de massa, na análise da metabolização de sildenafil (Weinman et al., 2001).

Na metabolização com hepatócitos de rato *in vitro*, sildenafil foi metabolizado principalmente em desmetil sildenafil, observado no cromatograma HPLC-UV após 30 minutos de incubação. Nos cromatogramas dos análogos de sildenafil, apenas o carbonato lodenafil apresentava metabolização, sendo o lodenafil o principal metabólito formado, após incubação com hepatócitos de rato *in vitro*.

O procedimento para a avaliação farmacocinética neste trabalho em cão, i.v. ou v.o., fornece um método por HPLC-MS/MS, rápido, reprodutivo e preciso para determinação de sildenafil, desmetil sildenafil, lodenafil, e análogos carbonato de lodenafil e anpalogo uretana. Este método demonstrou ser equivalente aos métodos já descritos na literatura para determinação de sildenafil em plasma, comparável a outros métodos de identificação de sildenafil por HPLC-MS/MS, que apresentam limite de detecção de 0,125-40,0 ng/ml (Wang et al., 2007).

O perfil farmacocinético de sildenafil foi avaliado em cães sadios da raça *beagle*, via intravenoso, e comparado aos análogos carbonato de lodenafil e análogo uretana. Sildenafil é um composto de caráter básico fraco (pK_a= 6,5) o qual é parcialmente ionizado em pH fisiológico (Walker et al., 1999) O composto é moderadamente lipofílico (log $D_{7,4}$= 2,7) (Terrentt et al., 1996). Estes parâmetros físico-químicos conferem as excelentes propriedades de absorção observadas com dose v.o. (Smith et al, 1990). Sildenafil e carbonato lodenafil exibiam um volume de distribuição em excesso (Vd= 2,66 ± 0,004 l/kg para sildenafil e 2,39 ± 1,38 l/kg para carbonato lodenafil) ao volume de água corpórea para o cão (~0,65 l/kg), indicando um alto grau de lipossolubilidade da droga nos tecidos. Walker *et al.* (1999) demonstraram a farmacocinética e o metabolismo do sildenafil em camundongos, ratos, coelhos, cães e no homem. Neste estudo, os valores obtidos em cães (1mg/ml, i.v.), foram: $T_{1/2}$ de 5,2 ± 2,1 h, Cl de 12 ± 4 ml/min/kg e Vd de 5,2 ± 1,6 l/kg, concluindo que a moderada lipofilicidade e natureza básica fraca do sildenafil, resultam em extensiva distribuição no tecido e *clearance* por metabolismo. Os resultados da farmacocinética neste estudo foram equivalentes aos obtidos pelo trabalho de Walker *et al.* realizados com cão, i.v., para o sildenafil. Era observado $T_{1/2}$ de 4,48 ± 1,4 h, Cl de 0,44 ±0,14 l/h/kg e Vd de 2,66 ± 0,004 l/kg para sildenafil após administração intravenosa.

Comparando o perfil cinético dos análogos, i.v., o carbonato de lodenafil apresentou Cmax de 583 ± 446 ng/ml e valores de $T_{1/2}$ relativamente curto (0,59 ± 0,27 h), sendo metabolizado em lodenafil, metabólito desmetil sildenafil dificilmente foi quantificado. O valor alto do V_d (2,39 ± 1,38 l/kg) e o caráter lipofílico que esta droga apresenta indica uma provável distribuição desta droga nos tecidos. Para o análogo uretana

a quantificação dos seus metabólitos foi relativamente baixa, possivelmente a ligação de uretana nas moléculas apresentava boa estabilidade quando administrada i.v. em cão. Para o carbonato de loenafil, o $T_{1/2}$ moderadamente longo v.o. (2,11 ± 3,00 h), comparado ao $T_{1/2}$ quando administrado i.v. (0,59 ± 0,27 h), sugere que a taxa de absorção limita a taxa de eliminação desta droga. A biodisponibilidade do carbonato de lodenafil demonstrou rápida e completa metabolização em lodenafil, provavelmente, seja em grande parte pelo efeito de primeria passagem dessa via, ocorendo hidrólise na ligação carbonato dessa molécula.

5- CONCLUSÃO

- O novo método de dosagem da atividade enzimática de PDEs por HPLC-MS/MS apresenta exatidão, precisão, sensibilidade e rapidez nas análises de nucleotídeos (GMPc, AMPc, GMP e AMP), podendo ser utilizado em estudos cinéticos e biomédicos.

- Os resultados sugerem que análogos de sildenafil inibem PDE5 do mesmo modo que sildenafil, *in vitro*. E aumentam a inibição induzida por NO exógeno, na agregação plaquetária.

- Após verificar estabilidade dos análogos, foi identificado como principal metabólito, lodenafil para o carbonato de lodenafill. Os análogos uréia e uretana não eram metabolizados por microssomas e hepatócitos de rato.

- O carbonato de loenafil é rapidamente biotransformado em lodenafil, após administração via intravenosa e oral em cão.

Como conclusão, este trabalho apresentou uma nova perspectiva terapêutica para a disfunção erétil, representada pelo carbonato de lodenafil o qual inibe concentração-dependente a atividade de PDE5.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alajoutsijarvi A, Nissinen E. Determination of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1987; 165:128-32.

Allerton CM, Barber CG, Beaumont KC, Brown DG, Cole SM, Ellis D, et al. A novel series of potent and selective PDE5 inhibitors with potential for high and dose-independent oral bioavailability. J Med Chem. 2006. 15:3581-94.

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; 159:2164-71.

Bardelle C, Smales C, Ito M, Nomoto K, Wong Ey, Kato H, et al. Phosphodiesterase 4 conformers: preparation of recombinant enzymes and assay for inhibitors, Anal. Biochem.1999; 275:148-155.

Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol Rev. 1995; 75:725-48.

Bellissant E, Chau NP, Giudicelli JF. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model relating lisinopril plasma cancontrations to regional hemodynamic effects in healthy volunteers. J Cardiovasc Pharmacol. 1996; 28:470-478.

Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev. 2006; 58:488-520.

Bolger GB. Molecular biology of the cyclic AMPspecific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. Cell. Signal. 1994; 6: 851-859.

Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, et al. 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.

Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. Br J Urol. 1996; 78:257-61.

Braun M, Wassmer G, Klotz T, Reifenrath B, Mathers M, Engelmann U. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the 'Cologne Male Survey'. Int J Impot Res. 2000;12:305-11.

Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. J Urol.1997; 157:320-324.

Butcher RW, Sutherland EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. J Biol Chem.1962; 237:1244-50.

Carson CC, Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. BJU Int. 2005; 96:257-280.

Chuang AT, Strauss JD, Murphy RA, Steers WD. Sildenafil, a type-5 CGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. J Urol. 1998; 160:257-61.

Cooper JD, Muirhead DC, Taylor JE, Baker PR. Development of an assay for the 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 Sci Appl. 1997; 701:87-95.

Coquil JF, Franks DJ, Wells JN, Dupuis M, Hamet P. Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3`:5`-monophosphate in rat platelets. Biochim Biophys Acta. 1980; 631:148-165.

Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). Neurochem Int. 2004; 45: 859-63.

Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J** Biol Chem. 1999; 274:13729-32.

Corbin JD. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. Int J Impot Res. 2004; 16:S4-S7.

Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis: essential role of nitric oxide signaling. J Biol Chem. 2005; 280:12944-12955.

Das S, Maulik N, Das DK, Kadowitz PJ, Bivalacqua TJ. Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3`,5`-monophosphate-specific phosphodiesterase 5. Drugs Exp Clin Res. 2002; 28:213-219.

Dunkern TR, Hatzelmann A. The effect of sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. Cell Signal. 2005; 17:331-339.

European Commission Council Decision, C. 2002; 3044.

Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, et al. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97:3702-3707.

Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, Mckinlay JB. Erectile dysfunction and coronary risk factors: Prospective results from the Massachusetts male aging study. Preventive Medicine.2000; 30:328-338.

Folts JD, Schafer AI, Loscalzo J, Willerson JT, Muller JE. A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. J Am Coll Cardiol. 1999; 33:295-303.

Fountain ST. A mass spectrometry primer. In: Rossi, D.; Sinz, M.W. Mass spectrometry in drug discovery. New York: Marcel Dekker, 2002.

Francis SH, Colbran JL, McAllister-Lucas LM, Corbin JD. Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. J. Biol. Chem. 1994; 269:22477-22480.

Francis SH, Lincoln TM, Corbin JD. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. J Biol Chem. 1980; 255:620-626.

Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001; 65:1-52.

Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. Nature Reviews Drug Discovery. 2006; 5:689-702.

Giordano D, De Stefano ME, Citro G, Modica A, Giorgi M. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. Biochim Biophys Acta. 2001; 1539:16-27.

Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. N. Engl.J.Med. 1998; 338:1397-1404.

Gresser U, Gleiter CH. Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil--review of the literature. Eur J Med Res. 2002; 7:435-46.

Gudmundsdottir IJ, Mcrobbie SJ, Robinson SD, Newby DE, Megson IL. Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 337:382-5.

Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Mincemoyer RA, Waclawiw M, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. J Am Coll Cardiol. 2002; 40:1232-40.

Hamet P, Coquil JF. Cyclic GMP binding and cyclic GMP phosphodiesterase in rat platelets. J Cyclic Nucleotide Res. 1978; 4:281-290.

Hassan MA, Ketat AF. Sildenafil citrate increases myocardial cGMP content in rat heart, decreases its hypertrophic response to isoproterenol and decreases myocardial leak of creatine kinase and troponin T. BMC Pharmacol. 2005; 5:10.

Hidaka H, Asano T. Human blood platelet 3': 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Isolation of low-Km and high-Km phosphodiesterase. Biochim Biophys Acta. 1976; 429:485-97.

Hidaka H, Tanaka T, Itoh H. Selective inhibitors of three forms of cyclic nucleotide phosphodiesterases. Trends Pharmacol. Sci. 1984; 5:237-239.

Hiratsuka T. New fluorescent analogs of cAMP and cGMP available as substrates for cyclic nucleotide phosphodiesterase. J Biol Chem. 1982 ; 257:13354-8.

Hoeper MM. Drug treatment of pulmonary arterial hypertension: current and future agents. Drugs. 2005; 65:1337-1354.

Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signaling cross-talk, desensitization and compartmentalization. Biochem J. 2003; 370:1-18.

Huai Q, Colicelli J, Ke H. The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis. Biochemistry. 2003b; 42: 13220-13226.

Huai Q, Liu Y, Francis SH, Corbin JD, Ke H. Crystal structures of phosphodiesterases 4 and 5 in complex with inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine suggest a conformation determinant of inhibitor selectivity. J. Biol. Chem. 2004a; 279: 13095-13101.

Huai Q, Wang H, Sun Y, Kim HY, Liu Y, Ke H. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. Structure. 2003a; 11: 865-873.

Huai Q, Wang H, Zhang W, Colman RW, Robinson H, Ke H. Crystal structure of phosphodiesterase 9 shows orientation variation of inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004b; 101: 9624-9629.

Humpl T, Reyes JT, Holtby H, Stephens D, Adatia I. Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension: twelvemonth clinical trial of a single-drug, open-label, pilot study. Circulation. 2005; 111:3274-3280.

Hyland R, Roe EG, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil. Br J Clin Pharmacol. 2001 ;51:239-48.

IMS Health. Market Share. IMS Health - Intelligence Applied, 2004. http://imshealth.com.

Ito M, Nishikawa M, Fujioka M, Miyahara M, Isaka N, Shiku H, Nakano T. Characterization of the isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human platelets and the effects of E4021. Cell Signal. 1996; 8:575-581.

Jackson G, Osterloh H. Past, present, and future: a 7- year update of Viagra (sildenafil citrate)[J]. Int J Clin Pract. 2005; 59:680-691.

Jeon YH, Heo YS, Kim CM, Hyun YL, Lee TG, Ro S, Cho JM. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. Cell Mol Life Sci. 2005; 62:1198-220.

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; 79:958-63.

Jin SL, Swinnen JV, Conti M. Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain. J. Biol. Chem. 1992; 267:18929-18939.

Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. Journal of Urology. 2000; 163:460-463.

Johnson JD, Walters JD, Mills JS. A continuous fluorescence assay for cyclic nucleotide phosphodiesterase hydrolysis of cyclic GMP. Anal Biochem. 1987; 162:291-5.

Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1999; 135:67-104.

Kim DK, Lee N, Lee JY, Ryu DH, Kim JS, Lee SH, et al. Synthesis and phosphodiesterase 5 inhibitory activity of novel phenyl ring modified sildenafil analogues. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2001a; 9:1609-1616.

Kim DK, Ryu DH, Lee N, Lee JY, Kim JS, Lee S, et al. Synthesis and phosphodiesterase 5 inhibitory activity of new 5-phenyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one derivatives containing an N-acylamido group on a phenyl ring. Bioorg Med Chem. 2001b; 9:1895-9.

Kim DK, Lee JY, Lee N, Ryu DH, Kim JS, Lee S, et al. 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, 9:3013-21.

Kotera J, Fujishige K, Imai Y, Kawai E, Michibata H, Akatsuka H, et al. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. Eur J Biochem. 1999; 262:866-873.

Kotera J, Fujishige K, Omori K. Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. J Histochem Cytochem. 2000; 48:685-693.

Kovala T, Sanwal BD, Ball EH. Recombinant expression of a type IV, cAMP-specific phosphodiesterase: characterization and structure-function studies of deletion mutants. Biochemistry. 1997; 36:2968-2976.

Laliberte F, Han Y, Govindarajan A, Giroux A, Liu S, Bobechko B, et al. Conformational difference between PDE4 apoenzyme and holoenzyme. Biochemistry. 2000; 39:6449-6458.

Langtry HD, Markham A. Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. Drugs. 1999; 57:967-89.

Lee H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectromettry (LC/MS). J. Liquid Cromatrogr & Related Technol. 2005; 28:1161-1202.

Lee ME, Markowitz J, Lee JO, Lee H. Crystal structure of phosphodiesterase 4D and inhibitor complex. FEBS Lett. 2002; 530:53-58.

Levin RM, Weiss B. Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain. Mol Pharmacol. 1976; 12:581-9.

Lewis GD, Semigran MJ. Type 5 phosphodiesterase inhibition in heart failure and pulmonary hypertension. Curr Heart Fail Rep. 2004; 1:183-189.

Li S, Barua AB, Huselton CA. Quantification of retinoyl-beta-glucuronides in rat urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J Chromatogr B Biomed Appl. 1996; 683:155-62.

Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF. Expression of three isoforms of cGMPbinding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 268:628-635.

Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, lue TF. Regulation of human PDE5A2 intronic promoter by cAMP and cGMP: identification of a critical Sp1-binding site. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 280:693-9.

Lin CS. Tissue expression, distribution, and regulation of PDE5. Int J Impot Res. 2004; 16:S8-S10.

Lodato RF. Viagra for impotence of pulmonary vasodilator therapy? Am J Respir Crit Care Méd. 2001; 163:312-3.

Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3`,5`- cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene. 1998; 216:139-147.

Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000; 27:313-319.

Maurice DH, Haslam RJ. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. Mol Pharmacol. 1990; 37:671-681.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. Circulation. 2002; 105:2398-403.

Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA, Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (ViagraTM) in the treatment of erectile dysfunction. Int. J. Impot. Res.1998; 10:69-74.

Moreira EDJr, Lbo CF, Diament A, Nicolosi A, Glasser DB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. Urology. 2003; 61:431-6.

Moreland RB, Goldstein I, Traish A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. Life Sci. 1998; 62:309-18.

Newton RP, Walton TJ, Basaif SA, Jenkins AM, Brenton AG, Ghosh D, Harris FM. Identification of butyryl derivatives of cyclic nucleotides by positive ion fast atom bombardment mass spectrometry and mass-analysed ion kinetic energy spectrometry Org. Mass Spectrom. 1989; 24:679-688.

Newton RP, Brenton AG, Ghosh D, Walton TJ, Langridge J, Harris FM, Evans AM. Qualitative and quantitative mass spectrometric analysis of cyclic nucleotides and related enzymes. Analytica Chimica Acta. 1991; 247:161-175.

Newton RP, Kingston EE, Overton A. Identification of novel nucleotides found in the red seaweed Porphyra umbilicalis. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995; 9:305-311.

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; 1:5S-12S.

Niessen WMA, Tinke AP. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, General principles and instrumentation. J. Chomatogr. A. 1995; 703:37-57.

Nordhoff E, Karas M, Cramer R, Hahner S, Hillenkamp F, Kirpekar F, et al. Direct Mass Spectrometric Sequencing of Low-picomole Amounts of Oligodeoxynucleotides with up to 21 Bases by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectroscopy J. Mass Spectrom. 1995; 30:99-112.

Ohba Y, Soda K, Zaitsu K. A sensitive assay of human blood platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase activity by HPLC using fluorescence derivatization and its application to assessment of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. Biol Pharm Bull. 2001; 24:567-9.

Padma-Nathan H, McMurray JG, Pullman WE, Whitaker JS, Saoud JB, Ferguson KM, et al. On-demand IC351 (Cialis) enhances erectile function in patients with erectile dysfunction. Int J Impot Res. 2001; 13:2-9.

Percival MD, Yeh B, Falgueyret JP. Zinc dependent activation of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE4A). Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 241:175-180.

Perry MJ, Higgs GA. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. Curr Opin Chem Biol. 1998; 2: 472-481.

Phillips S, Gbekor E, et al. Selectivity of Sildenafil and other Phosphodiesterases Typ 5 (PDE5) inhibitors against all human phosphodiesterase families. Abstract presented at EAU, Birmingham 2002.

Pradelles P, Grassi J, Chabardes D, Guiso N. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. Anal Chem. 1989; 61:447-53.

Prickaerts J, Sik A, Van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, Van der Staay FJ, et al. Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. Neurochem Int. 2004; 45:915-928.

Qian TQ, Cai ZW, Yang MS. Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Biochem. 2004; 325:77-84.

Qiu Y, Bhattacharjee S, Kraft P, John TM, Craig E, Haynes-Johnson D, et al. Characterization of a novel phosphodiesterase type 5 inhibitor: JNJ-10258859. Eur J Pharmacol. 2003; 472:73-80.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. Br. J. Pharmacol. 1990a; 101:325-328.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990b; 87: 5193-7.

Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by. tissue particles J. Biol. Chem. 1958; 232:1065-1076.

Rosen RC, Kostis JB. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. Am J Cardiol. 2003; 92:9M-18M.

Rybalkin SD, Rybalkina IG, Shimizu-Albergine M, Tang XB, Beavo JA. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. EMBO. Eur Mol Biol Organ J. 2003; 22:469-478.

Scapin G, Patel SB, Chung C, Varnerin JP, Edmondson SD, Mastracchio A, et al. Crystal structure of human phosphodiesterase 3B: atomic basis for substrate and inhibitor specificity. Biochemistry. 2004; 43:6091-6100.

Schilling RJ, Morgan DR, Kilpatrick BF. A high-throughput assay for cyclic nucleotide phosphodiesterases. Anal Biochem. 1994; 216:154-8.

Sheikh RA, Yasmeen S, Prindiville TP. Hemorrhoidal bleeding associated with sildenafil. Am J Gastroenterol. 2001; 96:2518-9.

Shimizu-Albergine M, Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Wolfsgruber W, Hofmann F, 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.

Smith DA, Humphrey MJ, Charuel C. Design of toxicokinetic studies. Xenobiotica. 1990; 20:1187-99.

Smith DA. Species differences in metabolism and pharmacokinetics: are we close to an understanding? Drug Metab Rev. 1991;23:355-73.

Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. Curr Opin Cell Biol. 2000; 12:174-9.

Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. J. Biol. Chem. 1995; 270: 30989-31000.

Stacey P, Rulten S, Dapling A, Phillips SC. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). Biochem Biophys Res Commun. 1998; 247:249-254.

Steiner MK, Preston IR, Klinger JR, Hill NS. Pulmonary hypertension: inhaled nitric oxide, sildenafil and natriuretic peptides. Curr Opin Pharmacol. 2005; 5:245-250.

Straub RF, Voyksner RD.. Negative ion formation in electrospray mass spectrometry J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993; 4:578-587.

Sung BJ, Hwang KY, Jeon YH, Lee JI, Heo YS, Kim JH, et al. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. Nature. 2003; 425: 98-102

Terrett DK, Bell AS, Brown D, Ellis P. Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. Bioorganic and medicinal Chemistry Letters. 1996; 6:1819-1824.

Texeira MM, Gristwood RW, Cooper N. Phsphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflamatory drugs of the future? Trends Pharmacol Sci. 1997; 18:164-71.

Thompson WJ, Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. Biochemistry. 1971; 10:311-6.

Thompson WJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. Pharmacol. Ther. 1991; 51: 13-33.

Torphy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 157:351-370.

TzathaS C, Christidou A, Ladas SD. Sildenafil (viagra) is a risk factor for acute variceal bleeding. Am J Gastroenterol. 2002; 97:1856.

Uckert S, Hedlund P, Andersson KE, Truss MC, Jonas U, Stief CG. Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. Eur Urol. 2006; 50:1194-207.

Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. Xenobiotica. 1999; 29:297-310.

Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. Am J Cardiol. 1999; 83:3C-12C.

Wang J, Jiang Y, Wang Y, Zhao X, Cui Y, Gu J. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine the pharmacokinetics of aildenafil in human plasma. J Pharm Biomed Anal. 2007; 44:231-5.

Warrington JS, Shader RI, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra): identification of human cytochromes and potential drug interactions. Drug Metab Dispos. 2000; 28:392-7.

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; 30:655-7.

Watanabe H, Ohashi K, Takeuchi K, Yamashita K, Yokoyama T, Tran OK, et al. Sildenafil for primary and secondary pulmonary hypertension. Clin Pharmacol Ther. 2002; 71:398-402.

Weinmann W, Bohnert M, Wiedemann A, Renz M, Lehmann N, Pollak S. Post-mortem detection and identification of sildenafil (Viagra) and its metabolites by LC/MS and LC/MS/MS. Int J Legal Med. 2001; 114:252-8.

Wells JN, Garst JE, Kramer GL. Inhibition of separated forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase from pig coronary arteries by 1,3-disubstituted and 1,3,8-trisubstituted xanthines. J. Med. Chem. 1981; 24:954-958.

Winter ME, Koda-kimple MA, Young LY. Farmacocinética clínica BÁSICA. 2ED. MADRID: Díaz de Santos S.A. 1994.

Witters E, Roef L, Newton RP, Van Dongen W, Esmans EL, Van onckelen HA. Quantitation of cyclic nucleotides in biological samples by negative electrospray tandem mass-spectrometry coupled to ion suppression liquid-chromatography. Rapid communications in mass spectrometry. 1996; 10:225-231.

Witters E, Dongen WV, Esmans EL, Van Onckelen HA. Ion-pair liquid chromatography - electrospray mass spectrometry for the analysis of cyclic nucleotides. J. Chromatogr. B. 1997; 694:55-63.

Wolter MA, Engels JW, Montanarella L, TIlio R, FacchettI S. Influence of the Matrix on the Analysis of Small Oligoribonucleotides by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, J. Mass. Spectrometry. 1995; 30:485-491.

Wood MA, Hess ML. Review: long-term oral therapy of congestive heart failure with phosphodiesterase inhibitors. Am. J. Med. Sci. 1989; 297:105-113.

Xu RX, Hassell AM, Vanderwall D, Lambert MH, Holmes WD, Luther MA, et al. Atomic structure of PDE 4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. Science. 2000; 288:1822-1825.

Xu RX, Rocque WJ, Lambert MH, Vanderwall DE, Luther MA, Nolte RT. Crystal structures of the catalytic domain of phosphodiesterase 4B complexed with AMP, 8-Br-AMP and rolipram. J. Mol. Biol. 2004; 337:355-365.

Yanaka N, Kotera J, Ohtsuka A, Akatsuka H, Imai Y, Michibata H, et al. Expression, structure and) Thchromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. Eur J Biochem. 1998; 255:391-399.

Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, et al. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. Mol. Cell. 2004; 15:279-286.

Zoraghi R, Bessay EP, Corbin JD, Francis SH. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. J Biol Chem. 2005; 280:12051-12063.