

Artigo

LASSBio-596: da Descoberta aos Ensaios Pré-clínicos

Rocco, P. R. M.;^a Xisto, D. G.;^a Silva, J. D.;^a Diniz, M. F. F. M.;^b Almeida, R. N.;^b Luciano, M. N.;^b Medeiros, I. A.;^b Cavalcanti, B. C.;^c Ferreira, J. R. O.;^c de Moraes, M. O.;^c Costa-Lotuf, L. V.;^c Pessoa, C. O.;^c Dalla-Costa, T.;^{d*} Cattani, V. B.;^d Barreiro, E. J.^e, Lima, L. M.^e

Rev. Virtual Quim., 2010, 2 (1), 10-27. Data de publicação na Web: 30 de agosto de 2010

<http://www.uff.br/rvq>

LASSBio-596: of the Discovery to the Pre-clinical Studies

Abstract: This paper revised the trajectory of the discovery of a new antiasthmatic drug candidate, 2-[4-(1,4-thiazinan-4-ylsulfonyl)phenylcarbamoyl]benzoic acid (LASSBio-596) until the accomplishment of the first pre-clinical studies, with focus on LASSBio-596's effects in murine asthma models, pharmacokinetic and toxicological studies and determination of genotoxicity and mutagenic profiles.

Keywords: asthma; LASSBio-596; toxicity; pharmacokinetic; genotoxicity; mutagenicity

Resumo

Neste artigo é revisado a trajetória que vai da descoberta de um novo candidato a fármaco antiasmático, o ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzoico (LASSBio-596), à realização dos primeiros ensaios pré-clínicos, com enfoque nos efeitos de LASSBio-596 em modelo murino de asma aguda e crônica, estudos farmacocinéticos e toxicológicos em roedores e determinação do seu potencial genotóxico e mutagênico.

palavras-chave: asma; LASSBio-596; toxicidade; farmacocinética; genotoxicidade; mutagenicidade

*LASSBio, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68024, CEP 21941-902, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

✉ lidia@pharma.uff.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20100003](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100003)

LASSBio-596: da Descoberta aos Ensaios Pré-clínicos

Patricia R. M. Rocco,^a Debora G. Xisto,^a Johnatas D. Silva,^a Magareth de F. F. M. Diniz,^b Reinaldo N. Almeida,^b Melissa N. Luciano,^b Isac A. Medeiros,^b Bruno C. Cavalcanti,^c José R. de O. Ferreira,^c Manoel O. de Moraes,^c Letícia V. Costa-Lotufo,^c Claudia do Ó Pessoa,^c Teresa Dalla-Costa,^d Vitória B. Cattani,^d Eliezer J. Barreiro^e, Lidia M. Lima^{e*}

^a Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Campus I, Universidade Federal da Paraíba. Caixa Postal 5009, 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil

^c Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo 1127, Rodolfo Teófilo, 60430-270, Fortaleza, CE, Brasil

^d Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS (CBIM/UFRGS). Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

^e LASSBio, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68024, RJ, 21944-970, Brasil

[*lidia@pharma.ufrj.br](mailto:lidia@pharma.ufrj.br)

Recebido em 01 de agosto de 2009. Aceito para publicação em 30 de março de 2010

1. Introdução

2. Asma

3. Inflamação & Remodelamento na asma

4. Evolução do tratamento

5. LASSBio-596: Farmacologia & Química

6. Farmacocinética

7. Toxicologia

7.1. Ensaio de toxicidade aguda

7.2. Ensaio de toxicidade crônica

7.3. Perfil toxicológico de LASSBio-596

8. Genotoxicidade & Mutagenicidade

8.1. Teste do Cometa

8.2. Teste de aberrações cromossômicas

9. Comentários finais

10. Glossário

1. Introdução

A descoberta de fármacos é um processo complexo, custoso e orquestrado, que exige trabalho em equipe e especialistas de várias áreas do conhecimento, particularmente das Ciências Biológicas, da Saúde e Ciências Exatas, Engenharias e da Terra. Trata-se de atividade multidisciplinar que desde seus primórdios tem a Química Medicinal como eixo central do processo.

O processo de descoberta de fármacos divide-se em 4 etapas, ilustradas na Figura 1, destacando-se as etapas de pesquisa e desenvolvimento. Na primeira etapa incluem-se atividades relacionadas à seleção do alvo molecular para intervenção em uma determinada fisiopatologia, desenvolvimento de ensaios farmacológicos específicos, que permitam aferir a atividade sobre o alvo selecionado e a eficácia em modelos experimentais da doença alvo, o desenho molecular racional de ligantes para o alvo eleito, caracterizando exemplo típico da estratégia conhecida por abordagem fisiológica, culminando na etapa crítica desta fase que inclui a descoberta do composto protótipo e sua otimização (Figura 1)¹. Concluída a etapa de pesquisa, inicia-se a etapa de desenvolvimento, dividida em fase inicial, caracterizada pela realização de ensaios pré-clínicos com o composto protótipo descoberto na etapa de

pesquisa, e fase tardia compreendendo a realização dos estudos clínicos de Fase I, Fase II e Fase III.

Embora toda etapa de pesquisa envolvida na cadeia de fármacos e medicamentos possa ser conduzida e realizada de forma adequada nos laboratórios de pesquisa das principais universidades brasileiras e de centro de pesquisas nacionais, a etapa de desenvolvimento exige parcerias com o setor empresarial público ou privado, constituindo a fase mais onerosa e demorada do processo de descoberta de fármacos.

O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR, CNPq/FAPERJ# 573.564/2008-6) tem como meta principal articular as competências nacionais existentes no País e situadas nos diferentes estágios da intrincada cadeia de inovação em Fármacos e Medicamentos, visando como objetivo precípuo à descoberta de fármacos 100% brasileiros. Desta forma, propicia ambiente favorável à inovação radical e incremental assegurando o trinômio Universidade-Governo-Empresa. Neste ambiente profícuo foi descoberto um novo candidato a fármaco antiasmático de mecanismo de ação original, *i.e.* LASSBio-596, cujas etapas de descoberta do composto protótipo a realização dos ensaios pré-clínicos serão revisadas neste manuscrito.



Figura 1. Representação esquemática e simplificada das etapas envolvidas no processo de descoberta de fármacos

2. Asma

A asma é definida como uma inflamação crônica das vias aéreas, onde há participação de muitas células, em especial: mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, neutrófilos e células epiteliais. Essa inflamação causa episódios recorrentes de tosse e dispnéia associados à obstrução do fluxo aéreo, que muitas vezes é reversível espontaneamente ou com tratamento. A inflamação também acarreta aumento na responsividade brônquica associada a uma variedade de estímulos.²

A asma é um importante problema de Saúde Pública em todo o mundo. Sua prevalência está aumentando tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, afetando pessoas de todas as idades, raças e grupos étnicos.² De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), ela atinge cerca de 300 milhões de pessoas no mundo e promove cerca de 250 mil mortes/ano. Estima-se que nos EUA a asma acometa 14 a 15 milhões de pessoas, das quais 4,8 milhões são crianças. Segundo dados do Estudo Internacional para Asma e Alergias na Infância (ISAAC, do inglês *International Study for Asthma and Allergies in Childhood*) publicado em 2002, mostra que a estimativa de prevalência no Brasil situava-se em torno de 20%. Em nosso país, a asma é responsável por aproximadamente 350 mil internações hospitalares pelo Sistema Único de Saúde (SUS) por ano.³ Dados do SUS revelam que, a cada ano, mais de 367 mil brasileiros dão entrada nos hospitais com diagnóstico da doença.⁴

3. Inflamação & Remodelamento na asma

Dentre os fatores que acarretam a inflamação persistente das vias aéreas, hiper-responsividade brônquica e obstrução do fluxo aéreo ressaltam-se o componente genético, exposições ocupacionais e ambientais. Quando a inflamação e a hiper-responsividade estão presentes, a asma pode ser desencadeada por fatores adicionais, incluindo o exercício, inalação de ar frio e seco, hiperventilação, fumaça de cigarro, estresse físico ou emocional, inalação de substâncias irritantes e agentes farmacológicos, como metacolina e histamina.

A inalação de alérgenos acarreta resposta inflamatória, cuja intensidade está relacionada com a gravidade da doença.⁵ A inflamação das vias aéreas na asma é um processo multicelular que envolve principalmente eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T CD4+ e mastócitos, sendo o infiltrado eosinofílico o

aspecto mais característico desta patologia.⁶ Esses infiltrados celulares liberam vários mediadores químicos tais como: histamina, proteínas eosinofílicas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária, que estão envolvidos na indução da hiper-responsividade das vias aéreas. Assim, o recrutamento dessas células da circulação para o local da inflamação é considerado um evento chave no desenvolvimento e manutenção da inflamação alérgica que ocorre na asma brônquica.⁷

A asma representa um processo inflamatório crônico das vias aéreas seguido por remodelamento. Remodelamento é um fenômeno que ocorre em todos os órgãos e que consiste em duas etapas: (1) regeneração, que é a substituição do tecido lesado por células parenquimatosas do mesmo tipo; e (2) substituição do tecido conectivo em tecido cicatricial.⁸ Os processos de diferenciação, migração e maturação celular assim como a deposição do tecido conectivo podem ser seguidos por uma restituição completa ou alterada da estrutura e função das vias aéreas, com o aparecimento de dano e metaplasia epitelial, espessamento da lâmina basal subepitelial, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso das vias aéreas, hiperplasia das glândulas mucosas, angiogênese e uma composição e deposição alterada das proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos.⁹

O remodelamento das vias aéreas é um termo que engloba as alterações das células estruturais e dos tecidos nas vias aéreas asmáticas. Este fenômeno é a consequência anatômica da ação da inflamação crônica na via aérea e reflete as alterações decorrentes do próprio processo inflamatório e a falta de reparo adequado à injúria crônica, gerando uma resposta anormal ou exagerada da lesão de via aérea.¹⁰ A interação adequada entre o epitélio da via aérea e as células mesenquimais subjacentes é essencial para o reparo adequado. Nesse contexto, o funcionamento anormal dessa unidade trófica epitelial-mesenquimal, ao permanecer ativa após o nascimento ou sendo reativada em indivíduos susceptíveis, tem sido apontado como elemento central da fisiopatologia característica da asma.¹¹

4. Evolução do tratamento

O foco do tratamento da asma vem mudando. Inicialmente, considerava-se a broncoconstrição como principal alvo para intervenção terapêutica; a seguir, objetivou-se o controle e tratamento da inflamação das vias aéreas. Na sequência, instituiu-se o tratamento associado (anti-inflamatório – *i.e.*

corticosteroide – e broncodilatador – *i.e.* agonista β_2 de ação prolongada – ambos de uso inalatório), cujo alvo era a doença já instalada. Apesar de o tratamento associado ser capaz de manter boa parte dos asmáticos assintomáticos, o controle da doença ainda é deficiente, o que, provavelmente, justifica-se pelos seguintes fatores: preço da medicação, corticosteroidofobia, desinformação, dentre outros. Com a maior compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na patogênese da asma, iniciou-se uma fase cujo alvo terapêutico incluiu, também, a prevenção do surgimento das lesões fixas e irreversíveis do aparelho respiratório.¹²

5. LASSBio-596: Farmacologia & Química

Inseridos numa linha de pesquisa que visava a identificação de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios simbióticos, foram descritos em 2001, o desenho, síntese e a avaliação do perfil anti-inflamatório, em modelo de inflamação pulmonar aguda, do ácido 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil)fenilcarbamoil]benzoico ou LASSBio-596.¹³ Este derivado original, cuja gênese foi recentemente revisitada,¹³ foi descrito, em 2003, como capaz de prevenir e tratar, em modelo murino, a síndrome do desconforto respiratório agudo,¹⁵ doença caracterizada por insuficiência respiratória aguda, decorrente de intensa resposta inflamatória, ocasionada por agressão pulmonar local (*e.g.*, pneumonias) ou sistêmica (*e.g.* septicemia).¹⁶

Considerando a natureza simbiótica de LASSBio-596, originalmente planejado como agente anti-TNF α e inibidor de PDEs (PDE-4 e PDE-5) e os resultados farmacológicos iniciais que revelavam a ação benéfica deste protótipo em distúrbios pulmonares, iniciou-se uma linha de pesquisa visando determinar a aplicabilidade terapêutica de LASSBio-596 no tratamento da asma aguda e crônica.

Camundongos C57BL/6J sensibilizados com ovalbumina (OVA, 50 μ g) associada a Al(OH)₃ e desafiados com instilações nasais diárias de ovalbumina foram tratados com LASSBio-596 (10 mg/kg, via oral) ou dexametasona (1 mg/kg, via oral) 1 hora antes de cada instilação. Vinte e quatro horas após o último desafio, a mecânica pulmonar foi computada pelo método de oclusão ao final da inspiração e, posteriormente, a celularidade total e diferencial, fração da área de colapso alveolar e índice

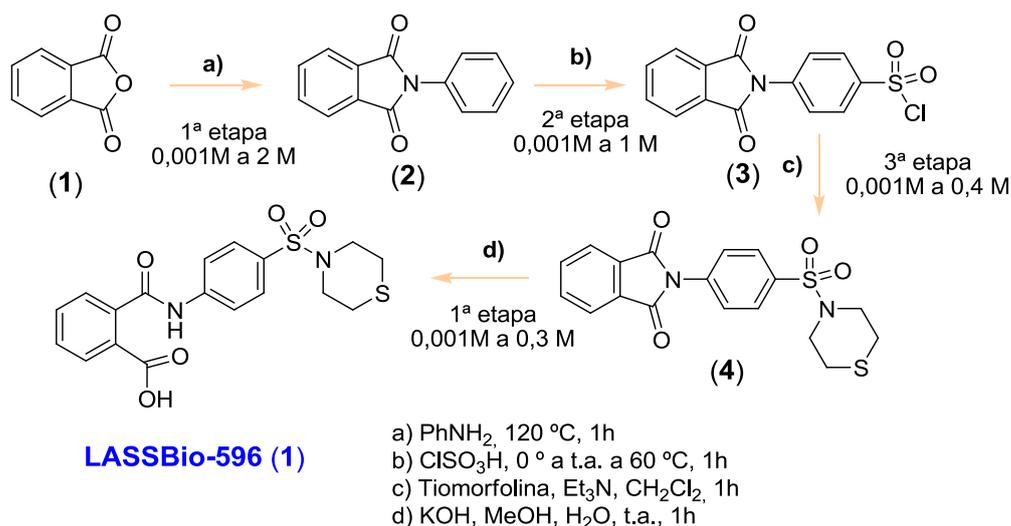
de broncoconstrição foram determinados. Nestes estudos, tanto LASSBio-596 quanto a dexametasona inibiram as modificações na mecânica e morfometria pulmonares, modulando a inflamação pulmonar e evitando as modificações funcionais observadas no modelo de asma alérgica aguda.^{17,18}

Ato seguinte, investigou-se a ação anti-asmática de LASSBio-596 em modelo murino de asma crônica. Campos e colaboradores demonstraram que em modelo murino de asma alérgica crônica são observados aumento da elastância estática do pulmão e aumento da resistência de vias aéreas centrais e periféricas, acompanhados de broncoconstrição, colapso alveolar, aumento do conteúdo de fibras colágenas (nas vias aéreas e no parênquima pulmonar) e fragmentação de fibras elásticas (nas vias aéreas), caracterizando o quadro clínico da doença. O tratamento com LASSBio-596 (10 mg/kg, via oral) inibiu a broncoconstrição e o remodelamento da via aérea e do parênquima pulmonar, evitando o colapso alveolar de forma mais efetiva do que a dexametasona, utilizada como padrão de referência. Ambos compostos evitaram as modificações na mecânica pulmonar induzidas pela asma e modularam o processo de fibrogênese por atuar inibindo TGF- β .¹⁹

LASSBio-596 quando administrado na dose de 10 mg/Kg via oral foi capaz de prevenir as alterações morfométricas e mecânicas do pulmão induzida pelo quadro de asma, diminuindo a broncoconstrição, bloqueando o processo de fibroproliferação e diminuindo a resistência das vias aéreas, configurando-se como legítimo candidato a fármaco anti-asmático e como possível opção para o tratamento da asma corticoide-resistente.

Do ponto de vista químico LASSBio-596 constitui uma molécula aquiral, da classe dos ácidos carbamoil-benzoicos, obtida por síntese linear em 4 etapas (Esquema 1). Estudos iniciais de escalonamento permitiram a obtenção de LASSBio-596 em escala de 0,3 Molar e rendimento global de 29%, enquanto os três intermediários sintéticos foram obtidos em escalas de 2 M, 1 M e 0,4 M, respectivamente (Esquema 1).

O controle de qualidade dos lotes obtidos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, análise elementar (CHN), calorimetria diferencial por varredura (DSC) e a estrutura do solvato confirmada por difração de raios-X.



Condições: a) PhNH₂, 120 °C, 1h; b) ClSO₃H, 0 ° → t.a. → 60°C, 1h; c) Tiomorfolina, Et₃N, CH₂Cl₂, 1h; d) KOH, MeOH, H₂O, t.a., 1h.

Esquema 1. Etapas e escala molar empregadas na síntese de LASSBio-596

6. Farmacocinética

Considerando a potencialidade terapêutica demonstrada pelo LASSBio-596, investigou-se sua farmacocinética pré-clínica em roedores após a administração pelas vias oral (p.o.) e intravenosa (i.v.). A avaliação farmacocinética nessa fase é importante para determinar os parâmetros que caracterizam a absorção (biodisponibilidade), distribuição (volume de distribuição) e eliminação (depuração e meia-vida), que informam como o fármaco é processado pelo organismo.

Os estudos farmacocinéticos foram conduzidos em ratos Wistar acordados e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Parecer 2007884). Os animais, divididos em grupos de dez, receberam LASSBio-596 na dose de 10 mg/kg pela via i.v. (veia lateral caudal) ou via p.o. (gavagem após jejum de 12 horas), na forma de solução aquosa. Após administração do LASSBio-596 foram coletadas amostras de sangue através da veia caudal, em tempos pré-determinados, por até 12 ou 18 horas, respectivamente, para as vias i.v. e oral. O plasma foi separado para quantificação de LASSBio-596 utilizando método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, validado segundo normas da *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).²⁰

A Figura 2 mostra o perfil médio de concentração plasmática por tempo do LASSBio-596 após administração de 10 mg/kg. Pode-se observar que a substância se distribui rapidamente no organismo

após dose i.v., sendo eliminada mais lentamente. Após administração p.o. da mesma dose, obtêm-se concentrações plasmáticas muito inferiores, indicando uma biodisponibilidade reduzida.²¹ Os parâmetros farmacocinéticos obtidos pela análise individual dos perfis utilizando abordagem não-compartimental estão mostrados na Tabela 1.²² Os parâmetros farmacocinéticos do LASSBio-596, determinados a partir dos perfis plasmáticos resultantes da administração i.v. e p.o. obtidos foram comparados estatisticamente pelo método ANOVA ($\alpha = 0,05$).

A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do LASSBio-596 mostra que ele apresenta um tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de $6,0 \pm 2,3$ h, um volume de distribuição (Vd) baixo ($0,23 \pm 0,12$ L/kg) e uma depuração total (CL_{tot}) de $0,30 \pm 0,12$ L/kg/h. Após administração oral, LASSBio-596 mostrou uma diferença significativa na área sob a curva (ASC), levando a determinação de biodisponibilidade oral de 3,6%.

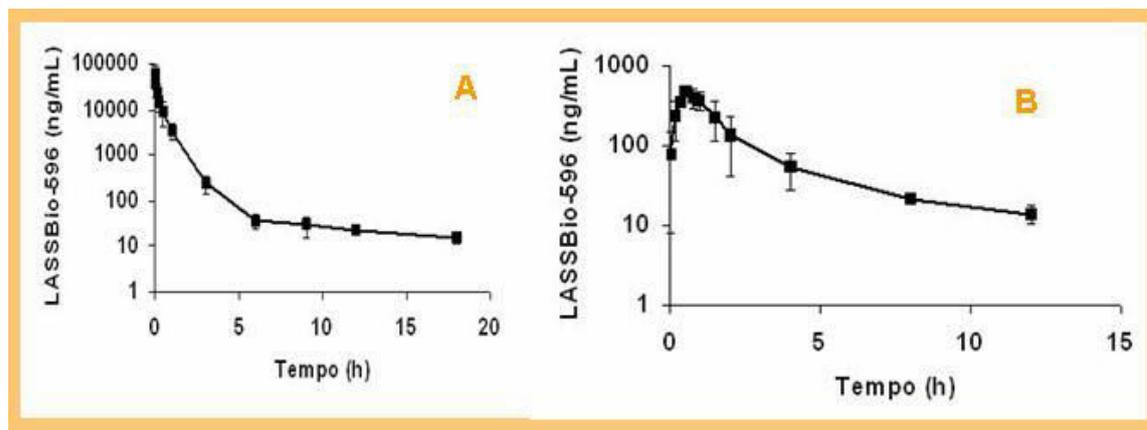


Figura 2. Perfil plasmático médio de LASSBio-596 após administração de 10 mg/kg pelas vias i.v. (A) e p.o. (B) a ratos Wistar (n = 10/grupo)

Tabela 1. Parâmetros farmacocinéticos do LASSBio-596 após administração de 10 mg/kg a ratos Wistar

Parâmetros	10 mg/kg i.v.	10 mg/kg p.o.
λ (h^{-1})	0,13 ± 0,04	0,30 ± 0,10
$t_{1/2}$ (h)	6,0 ± 2,3	2,0 ± 0,2
ASC _{0-∞} (μg·h/mL)	39,6 ± 19,3	1,4 ± 0,4*
CL _{tot} (L/h/kg)	0,30 ± 0,12	0,22 ± 0,06
Vd (L/kg)	0,23 ± 0,12	-
C _{max} (ng/mL)	-	492,5 ± 141,9
t _{max} (h)	-	0,6 ± 0,2
F _{abs} (%)	-	3,6

λ = constante de velocidade de eliminação, $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida, ASC_{0-∞} = área sob a curva, CL_{tot} = depuração, Vd = volume de distribuição, C_{max} = pico de concentração, t_{max} = tempo máximo, F_{abs} = biodisponibilidade absoluta. *Diferença significativa em relação à dose de 10 mg/kg i.v. ($\alpha = 0,05$).

A baixa extensão de absorção do LASSBio-596 (via oral) pode estar relacionada com um processo de degradação da substância no trato gastrointestinal, com metabolismo de primeira-passage ou ainda com o efluxo da substância a partir da parede intestinal mediado, por exemplo, pela glicoproteína-P (P-gP), uma proteína transportadora amplamente expressa na mucosa do intestino delgado e grosso considerada responsável pela absorção incompleta de diversos fármacos administrados por esta via.²³

A possibilidade do LASSBio-596 ser substrato para a (P-gP) foi investigada pela co-administração de um inibidor desse transportador, o verapamil. A dose de verapamil suficiente para inibição da P-gP (40 mg/kg) foi administrada pela via oral a ratos Wistar (n = 6), 30

min antes da administração oral de 10 mg/kg de LASSBio-596, como previamente descrito na literatura em experimento semelhante.²⁴ A avaliação do perfil plasmático do LASSBio-596 mostrou que a extensão de absorção não foi afetada, obtendo-se uma ASC_{0-∞} de 1,9 ± 0,9 μg·h/mL, semelhante à determinada para o composto sozinho ($\alpha = 0,05$) (Tabela 1), levando a determinação de biodisponibilidade de 5% quando em associação com o verapamil. A manutenção da biodisponibilidade indica que o inibidor da P-gP não interferiu significativamente com a absorção do LASSBio-596, sugerindo que fatores como degradação intestinal ou metabolismo de primeira passagem são as hipóteses mais plausíveis para explicar a baixa absorção oral dessa molécula.

Em função da atividade demonstrada pelo LASSBio-596 em modelos de asma aguda e crônica determinou-se sua penetração no pulmão, bem como nos órgãos de eliminação. A penetração tecidual foi determinada após administração i.v. de 10 mg/kg. Em tempos pré-determinados após a administração, os animais foram sacrificados (3/tempo de coleta) e o pulmão, fígado e rins foram coletados,

cuidadosamente secos com papel absorvente, para retirada do excesso de sangue superficial, acondicionados, pesados e congelados em nitrogênio líquido até o dia da análise. Nos homogeneizados desses tecidos, preparados em acetato de etila (2,5 mL/g de tecido), foi quantificado o LASSBio-596. Os perfis médios obtidos estão mostrados na Figura 3.²¹

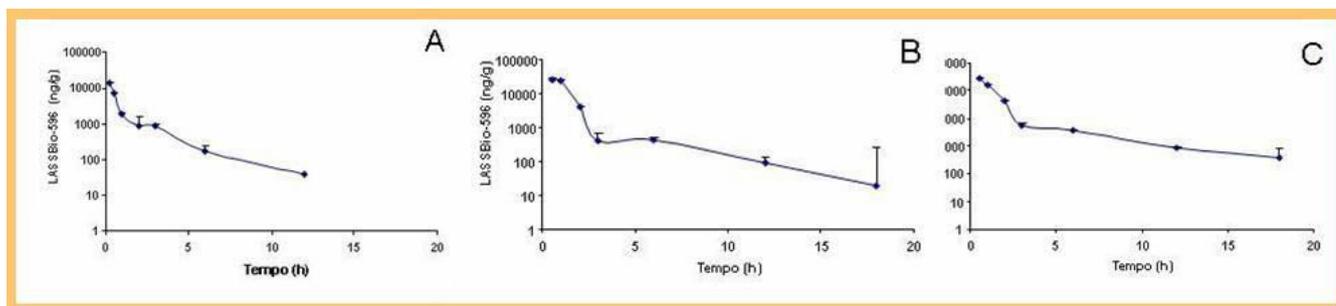


Figura 3. Perfis de concentração versus tempo após administração do LASSBio-596 na dose de 10 mg/kg i.v. em ratos Wistar (n = 3/tempo): (Painel Superior) pulmão, (Painel Meio) rins e (Painel Inferior) fígado. (Média + DP)

Para os três tecidos analisados, o tempo para o pico de concentração foi de 15 a 30 min após administração, demonstrando uma distribuição relativamente rápida da substância para o meio extravascular. Os perfis pulmonares e renais foram semelhantes, mostrando uma penetração equivalente de LASSBio-596 nesses tecidos, com pico de concentração pulmonar de $14 \pm 5 \mu\text{g/g}$ e renal de $32 \pm 16 \mu\text{g/g}$. No tecido hepático, no entanto, a penetração foi maior, obtendo-se concentrações máximas de $160 \pm 42 \mu\text{g/g}$. O tempo de meia-vida nos três tecidos ficou em torno de 2 a 3 h. As elevadas concentrações determinadas no tecido hepático poderiam estar relacionadas com a elevada vascularização desse órgão e, portanto, com maior contaminação sanguínea no homogeneizado, o que pode contribuir para o aumento dos valores de concentração e penetração tecidual relativa.²⁵

A alta penetração tecidual observada para LASSBio-596 é coerente com sua baixa ligação a proteínas plasmáticas, $22,6 \pm 14,7\%$, determinada por ultrafiltração.

Os resultados de farmacocinética do LASSBio-596 obtidos em roedores mostraram uma baixa biodisponibilidade oral e um tempo de meia-vida curto. Esses resultados, no entanto, não podem ser extrapolados para humanos uma vez que os processos de disposição de fármacos em roedores são muito mais rápidos que em humanos. Os resultados apontam, no entanto, para a necessidade de se esclarecer os mecanismos envolvidos com a baixa

extensão de absorção pela via oral bem como para busca de vias de administração alternativas, como a via pulmonar, que seria coerente com a aplicação clínica desse protótipo.

7. Toxicologia

Ato seguinte, foi investigada a toxicidade aguda (administração única seguida de 14 dias de observação) e crônica (90 dias de tratamento) de LASSBio-596 em roedores.

Para tanto, foram utilizados ratos Wistar e camundongos Swiss, provenientes do Biotério Prof. George Thomas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba.

Nos experimentos, todos os animais foram mantidos em iguais condições de temperatura, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a ração e água.

7.1. Ensaio de Toxicidade Aguda

Os grupos teste e controle foram compostos por seis animais machos e por seis animais fêmeas (ratos e camundongos).

Os animais do grupo teste foram submetidos à administração por gavagem de doses de 2000 mg/Kg do protótipo antiasmático LASSBio-596. Nos animais do grupo controle, foi administrado por via oral apenas o veículo (utilizado na diluição do composto

em questão).

Após a administração de LASSBio-596, os animais foram observados para a detecção de possíveis sinais tóxicos de caráter geral (protocolo de triagem farmacológica comportamental) nos intervalos de 0, 15, 30 e 60 minutos a cada 4 horas, até completar 24 horas, e diariamente durante 14 dias. No 14^o dia, os animais tratados foram sacrificados por tração cervical e seus órgãos coletados (pulmões, estômago, rins, coração e fígado) para análise histopatológica.

7.2. Ensaio de Toxicidade Crônica

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com administração de LASSBio-596 por via oral durante 90 dias:

1. O grupo controle (10 machos e 10 fêmeas) recebeu apenas o veículo utilizado na diluição do composto em questão;
2. O grupo 10 (10 machos e 10 fêmeas) foi tratado com a substância teste numa dose correspondente a ED₅₀ de LASSBio-596 (*i.e.* 10 mg/Kg/dia);
3. O grupo 50 (10 machos e 10 fêmeas) foi tratado com uma dose correspondente a cinco vezes a ED₅₀ de LASSBio-596 (50 mg/Kg/dia);
4. O grupo 250 (10 machos e 10 fêmeas) foi tratado com uma dose correspondente a vinte e cinco vezes a ED₅₀ do composto (250 mg/Kg/dia).

Os parâmetros observados no estudo de toxicidade crônica incluíram: a) testes comportamentais (campo aberto e “rota-rod” de 15 em 15 dias), b) variação de peso (semanal), c) temperatura (quinzenal), d) glicemia (quinzenal), e)

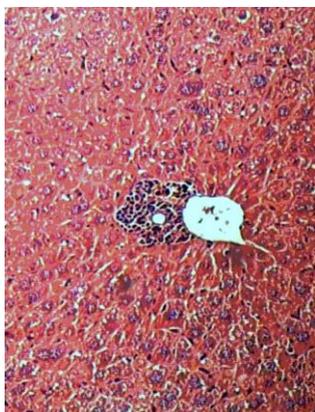


Figura 4. Foto ilustrando a necrose hepática lobular focal, discreta, associada à reação inflamatória linfomonocitária (zona II e zona III). Perivenulite (veia hepática terminal), focal. Portite linfomonocitária (discreta e focal)

consumo diário de alimento e água. Após 90 dias de tratamento, os animais do grupo controle e teste foram mortos por tração cervical e seus órgãos examinados macroscopicamente. Desta forma, coração, pulmões, fígado, rins e estômago foram retirados, colocados em formol 10% para posterior análise histopatológica. O sangue foi coletado via plexo braquial e/ou via orbital, para a realização de exames hematológicos (hemograma com contagem diferencial de leucócitos) e exames bioquímicos (glicemia, uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, ácido úrico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, colesterol e frações, amilase, proteínas totais, albumina, globulina, bilirrubina total, direta e indireta, creatinina, sódio, potássio, cálcio, fósforo e magnésio). Os valores foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m), sendo utilizados os testes t de Student e análise de variância “one way” (ANOVA), seguida de Bonferroni para amostras pareadas e não pareadas. Foram considerados valores estatisticamente significantes quando o $P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,001$. Os dados foram analisados através do programa estatístico Graph Pad Prism 4.0.

7.3. Perfil Toxicológico de LASSBio-596

A administração oral de 2000 mg/kg de LASSBio-596 não induziu morte em nenhum dos animais, até 14 dias após a administração única do composto.

Como mostram as figuras 4, 5, 6, 7 e 8, a análise histopatológica do estudo de toxicidade aguda revela que em camundongos ocorreram alterações no fígado, rins e estômago, após a administração via oral em dose única de 2000 mg/Kg de LASSBio-596.

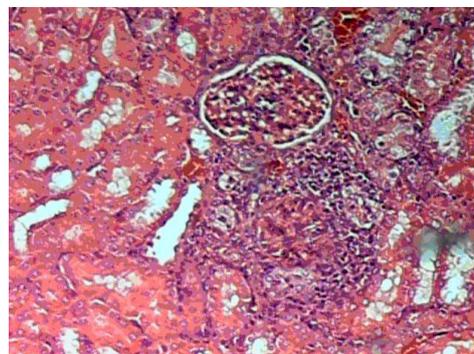


Figura 5. Foto evidenciando nefrite intersticial crônica com infiltrado linfomonocitário

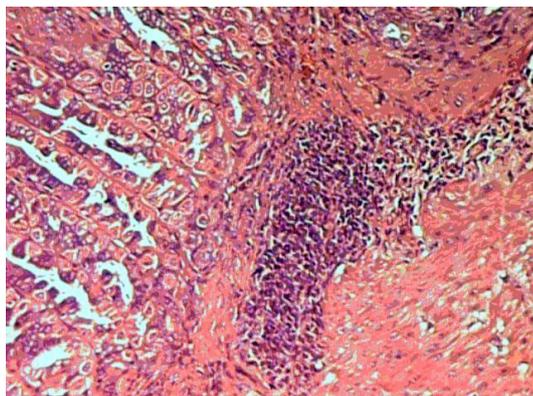


Figura 6. Ilustração de gastrite crônica moderada e quiescente

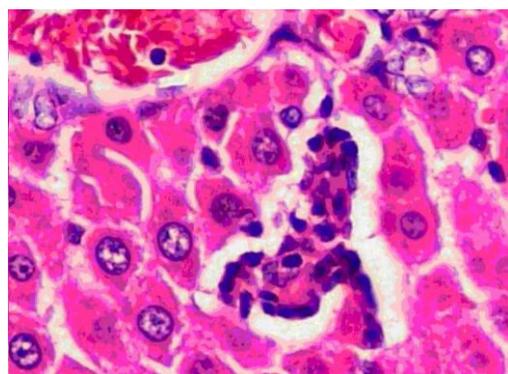


Figura 7. Imagem de necrose lobular associada ao fluxo de células inflamatórias



Figura 8. Figura evidenciando esteatose

De forma análoga aos resultados obtidos nos estudos de toxicidade aguda, após um período de tratamento de 90 dias com doses diárias (*p.o*) do protótipo LASSBio-596, não foram observadas mortes em nenhum dos grupos estudados.

Durante o período de tratamento dos animais por 90 dias, em diferentes doses, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao consumo de água e ração, glicemia (quinzenal), evolução ponderal e temperatura, nem em ratos

machos nem em fêmeas.

Os testes comportamentais do estudo toxicológico crônico demonstraram em animais machos diminuição do número de ambulações, diminuição no tempo de “rota rod” e aumento no número de “rearing”, no entanto, tais alterações não são de importância clínica, uma vez que não ocorreram de maneira dose-dependente, tampouco, evoluíram de maneira temporal, se caracterizando como alterações pontuais e eventuais.

A análise histopatológica do estudo de toxicidade crônica (Figuras 9, 10, 11 e 12) revelou em animais fêmeas alterações no estômago (na dose de 10 mg/Kg), no fígado (na dose de 10 mg/Kg) e pulmões (nas dose de 10, 50 e 250 mg/Kg).

Já em ratos machos, a análise histopatológica revelou alterações no estômago (dose de 50 mg/Kg) e pulmões (dose de 250 mg/Kg).

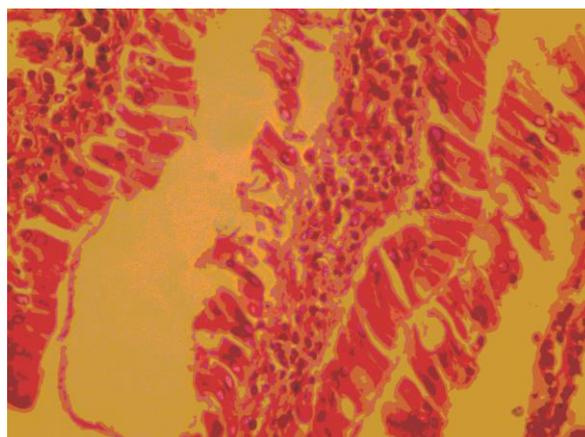


Figura 9. Figura ilustrando gastrite crônica quiescente

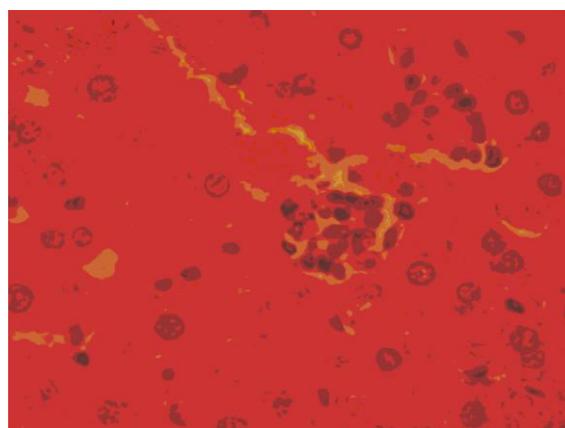


Figura 10. Ilustração de necrose lobular ocasional com reação inflamatória mononuclear, acometendo a zona II do lóbulo hepático

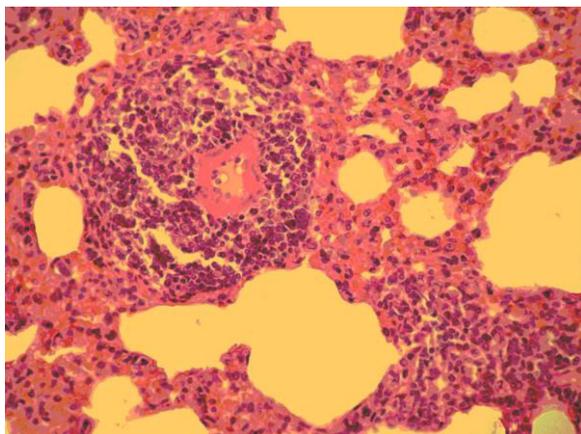


Figura 11. Foto evidenciando pneumonite crônica focal

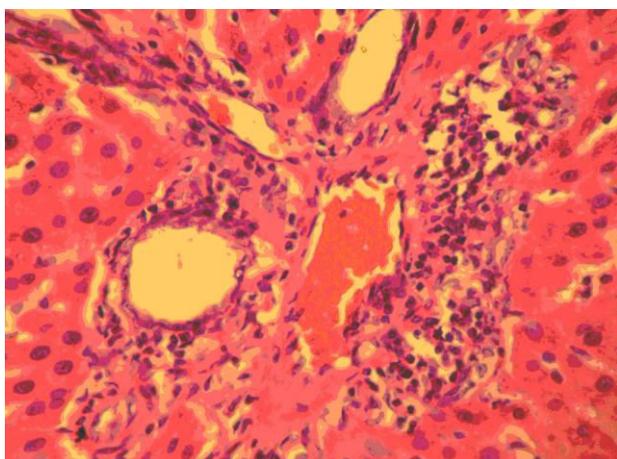


Figura 12. Ilustração de hepatite crônica periportal discreta

A análise hematológica e bioquímica dos animais fêmeas do estudo crônico revelou diminuição da concentração sanguínea de ácido úrico (dose 50 mg/Kg), de transaminase glutâmico pirúvica (dose 50 mg/Kg) e de magnésio (dose de 10 e 50 mg/Kg) e aumento da concentração sanguínea de creatinina (dose 10 mg/Kg), glicose (dose 250 mg/Kg) e amilase

(dose 250 mg/Kg). No hemograma, a hemoglobina corpuscular média apresentou-se diminuída (dose de 10 e 250 mg/Kg) e o volume corpuscular médio aumentado (dose 50 mg/Kg).

Nos animais machos houve aumento da concentração sanguínea de magnésio (dose de 10 mg/Kg), diminuição da concentração sanguínea de triglicerídeos (dose de 250 mg/Kg) e de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (dose de 10 e 250 mg/Kg).

No sangue dos animais fêmeas do grupo tratado com LASSBio-596 por 90 dias, foram analisados outros parâmetros hematológicos. Nestas análises observou-se que os valores de hematócrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (MCH), contagem de glóbulos vermelhos (RBC), contagem de glóbulos brancos (WBC), plaquetas e contagem diferencial de leucócitos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (Figura 13). A concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) do grupo tratado apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle nas doses de 10 mg/Kg e 250 mg/Kg e o volume corpuscular médio (MCV) de fêmeas apresentou diferença significativa na dose de 50 mg/Kg ($p < 0,05$).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, foi observada para os valores de hematócrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (MCH), volume corpuscular médio (MCV), contagem de glóbulos vermelhos (RBC), contagem de glóbulos brancos (WBC) (Figura 14), plaquetas e contagem diferencial de leucócitos em animais machos tratados, com LASSBio-596.

As alterações dos exames bioquímicos do grupo tratado em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) são mostradas na Tabela 2.

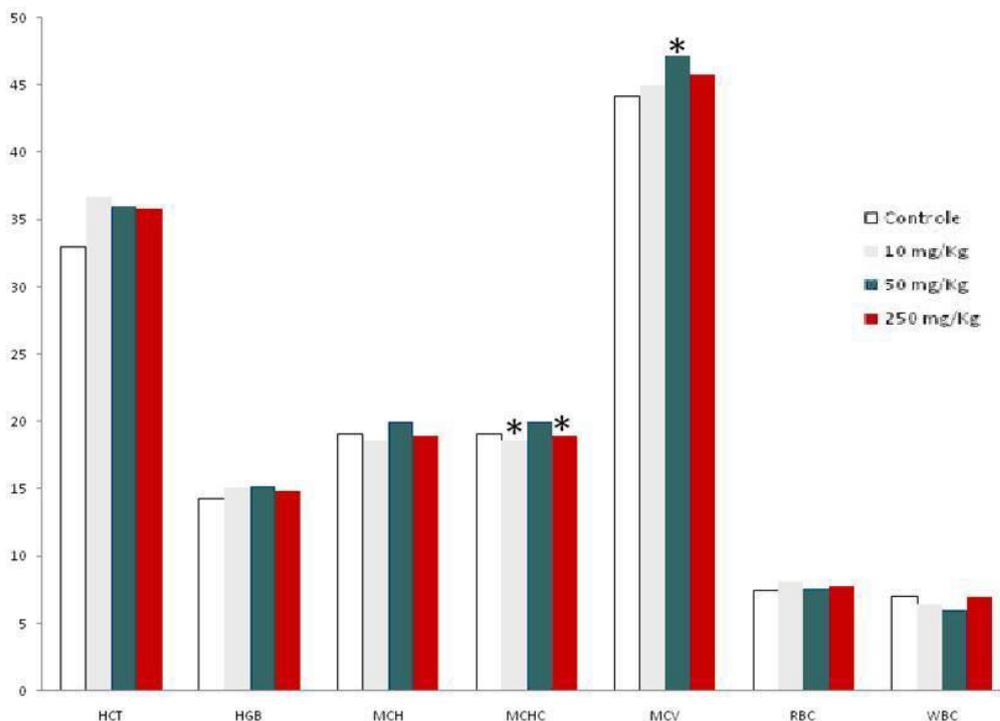


Figura 13. Hemograma (rato fêmea) (*p<0,05). HCT = hematocrito; HGB = hemoglobina; MCH = hemoglobina corpuscular média; MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média; MCV= volume corpuscular médio; RBC = glóbulos vermelhos ; WBC = glóbulos brancos

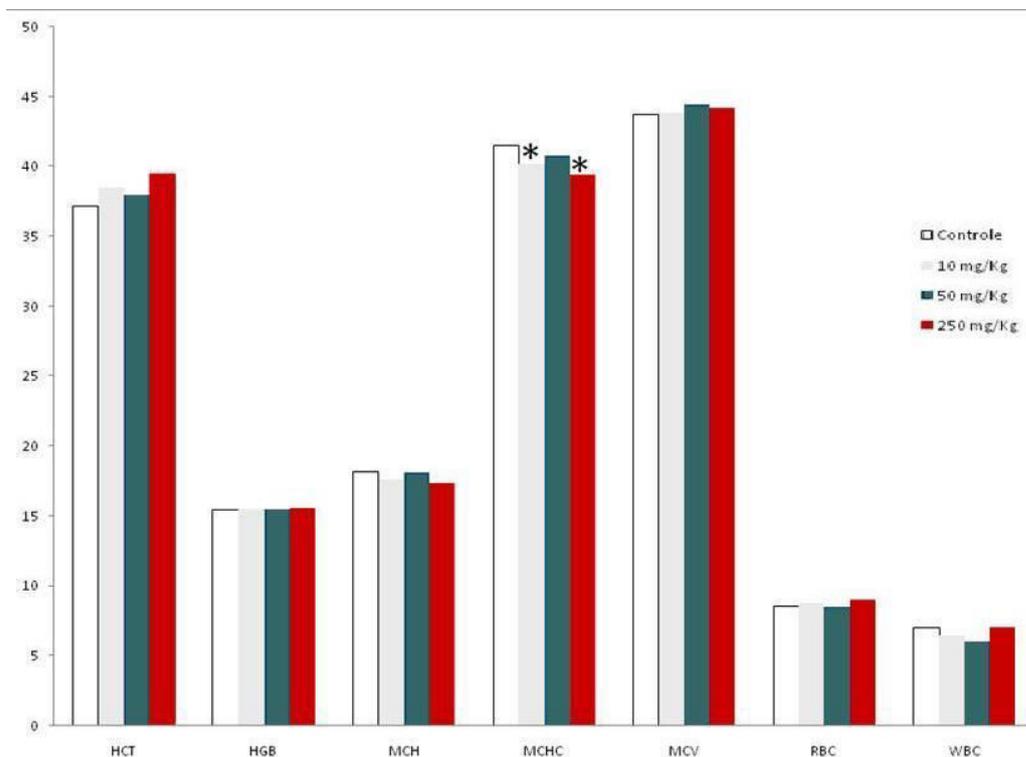


Figura 14. Hemograma (rato macho) (*p<0,05). HCT = hematocrito; HGB = hemoglobina; MCH = hemoglobina corpuscular média; MCHC = concentração de hemoglobina corpuscular média; MCV= volume corpuscular médio; RBC = glóbulos vermelhos ; WBC = glóbulos brancos

Em resumo, os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda (14 dias) e crônica (90 dias) de LASSBio-596 (via oral) em roedores *Rev. Virtual Quim.* |Vol 2| |No. 1| |10-27|

revelaram que em doses até 200 vezes aquela estimada para os testes farmacológicos *in vivo*, a administração do composto não induziu mortes.

Este resultado é importante, uma vez que a Organização Mundial da Saúde recomenda que para um medicamento chegar ao mercado é necessária uma relação maior que 30 entre a DE₅₀ e a DL₅₀. Um dos pontos importantes é que as alterações observadas em resposta à dose de 2000 mg/kg, por via oral, podem ser provavelmente devidas à grande quantidade de composto administrado, não sendo as mesmas de importância clínica significativa.

A análise histopatológica do estudo de toxicidade crônica revelou em animais fêmeas alterações no estômago (dose de 10 mg/Kg), fígado (dose de 10 mg/Kg) e pulmões (dose de 10, 50 e 250 mg/Kg). Em machos foram observadas alterações no estômago (dose de 50 mg/Kg) e pulmões (dose de 250 mg/Kg). Tais alterações não devem ter grandes implicações clínicas, uma vez que ocorreram de maneira pontual e, em alguns casos, isolada na escala temporal.

Tabela 2. Alterações em exames bioquímicos com significância estatística ($p < 0,05$). ALT: transaminase glutâmica pirúvica; AST: transaminase glutâmica oxalacética; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; BT: bilirrubina total; CK: creatina quinase; FAL: fosfatase alcalina; PT: proteína total; C: controle; DU: 10 mg/Kg

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS ($p < 0,05$)	Fêmeas				Machos			
	C	DU	5 DU	25 DU	C	DU	5 DU	25 DU
Ácido Úrico			x					
Albumina								
Amilase				x				
ALT			x					
AST								
BD								
BI								
BT								
Cálcio								
CK								
Colesterol								
Creatinina		x						
FAL								
Fósforo								
Glicemia				x				
Globulina								
Magnésio		x	x			x		
Potássio								
PT								
Sódio								
Triglicerídeos								x
Uréia								

8. Genotoxicidade & Mutagenicidade

A caracterização do eventual perfil de genotoxicidade *in vitro* de LASSBio-596 foi realizada utilizando-se os testes de análise do cometa,²⁶ aberrações cromossômicas²⁷ e avaliação da morte celular (*i.e.* citotoxicidade).²⁸

Para análise estatística dos resultados obtidos nos experimentos, foram utilizados os testes ANOVA e Tukey no software Prism® versão 4.0 (GraphPad

Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

8.1. Teste do Cometa

O teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* tornou-se, nos últimos dez anos, um dos principais métodos para estudo de lesões no DNA, com aplicabilidade em estudos de genotoxicidade.²⁶

Neste teste, linfócitos humanos ($0,5 \times 10^5$

células/mL) foram cultivados na presença de concentrações crescentes (25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL) do protótipo LASSBio-596, durante 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1%) como controle negativo.

Após o tratamento, as células foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (25 V; 300 mA) durante 20 minutos. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20µg/mL). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina²⁹ e classificados, por análise visual, dentre cinco

categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula. O índice de dano (ID) foi calculado através da multiplicação do total de cada tipo de cometa por seus escores (0, 1, 2, 3 e 4). Logo, os valores de ID podem variar de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo).

Nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 µg/mL LASSBio-596 não apresentou efeito genotóxico. Apenas na maior concentração, LASSBio-596 induziu um aumento significativo no índice de dano ao DNA de linfócitos expostos ($p < 0,001$) (Figura 15).

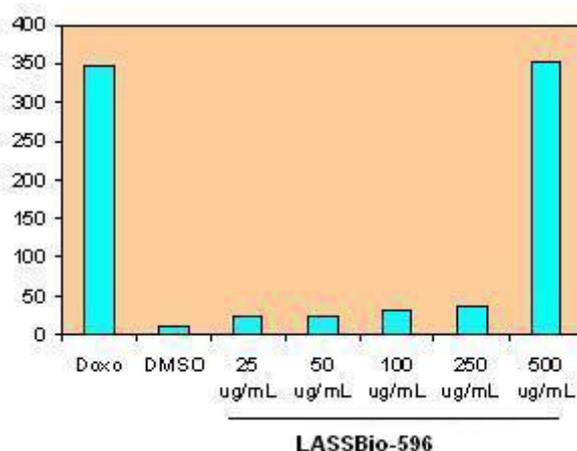


Figura 15. Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos tratados durante 24 horas com o composto LASSBio 596 (A) DMSO (veículo) e a doxorrubicina (Doxo, 0,3 µg/mL) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA/Tukey

8.2. Teste de aberrações cromossômicas

Para o estudo sobre o eventual perfil de mutagenicidade de LASSBio-596 foi empregado o teste de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos humanos, um dos métodos mais sensíveis para a detecção de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, sendo complementar ao teste de Ames.²⁷

Neste ensaio, as possíveis alterações do DNA são observadas através da análise de aberrações cromossômicas, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparo das quebras nas cadeias do DNA.

Desta forma os experimentos foram realizados utilizando linfócitos humanos ($0,5 \times 10^5$ células/mL) cultivados na presença de concentrações crescentes

(25; 50; 100; 250 e 500 µg/mL) de LASSBio 596, durante 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de tratamento, as culturas foram centrifugadas e lavadas com PBS. Depois, as culturas de linfócitos foram re-incubadas por um período de 48 h.

Duas horas antes do término do tempo de incubação, foi adicionada em todas as culturas uma solução de colchicina (0,0016%) para a obtenção de metáfases. Posterior ao tempo de cultivo, as culturas foram fixadas com uma solução de metanol/ácido acético (3:1) mantida previamente gelada (4°C).

Após a etapa de fixação, cinco lâminas por cultura foram montadas e coradas com Giemsa (5%). A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com a finalidade de se detectar possíveis alterações cromossômicas estruturais ou numéricas

nas metáfases dos linfócitos. Os cromossomos foram analisados com a objetiva de imersão (100 x), em lâminas codificadas, observando-se a posição do centrômero, alterações no grau de ploidia e aberrações estruturais segundo Savage (1975).³⁰

Os parâmetros analisados foram a frequência de células com aberrações cromossômicas em 100 metáfases/cultura e o índice mitótico (IM), determinado pela contagem do número de metáfases em 2000 linfoblastos/cultura. O IM representa a proporção de células em divisão. Uma redução nos valores de IM pode refletir a inibição da progressão do ciclo celular e/ou uma perda da capacidade proliferativa.

O IM foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de metáfases} \times 100}{\text{Número total de linfoblastos}}$$

A redução dos valores do índice mitótico (IM) observado para LASSBio-596 indica que o composto exerce efeitos citotóxicos a partir da concentração de 100 µg/mL (246 µM). Na concentração de 500 µg/mL (1230 µM) não foi possível a observação de metáfases. Nesta concentração, muitas células com núcleos e membranas fragmentadas com características apoptóticas e necróticas foram observadas. As mesmas observações morfológicas foram constatadas nas concentrações inferiores avaliadas, mas em menor magnitude, através da coloração diferencial por brometo de etídio e acridina laranja (Figura 16). A ausência de proliferação celular (Tabela 3) e a drástica redução da viabilidade celular (Figura 16) evidenciam que o alto valor do índice de dano (ID) no ensaio do cometa na concentração de 500 µg/mL (Figura 16) é indicativo de citotoxicidade e ausência de genotoxicidade.

Tabela 3. Efeito do LASSBio-596 sobre a proliferação e indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos após 24 horas de exposição

			Número de Aberrações por Indivíduo ^b																
	Tratamento	IM ^a (%)	Gaps				RUP ^c				POL ^d				ENDO ^e			Células aberrantes (%) ^f	
Controles	DMSO	6,9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	Doxo	1,2*	3	3	2	4	3	5	1	3	1	0	1	0	0	0	0	0	2,3 ± 0,2
LASSBio-596	25 µg/mL	6,5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1 ± 0,2
	50 µg/mL	6,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	100 µg/mL	5,3**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	250 µg/mL	4,7**	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	500 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aÍndice mitótico; ^bNúmero de aberrações em 100 metáfases analisadas; ^crupturas na cromatina dos cromossomos (quebras cromatídicas ou cromossômicas); ^dCélulas poliploides; ^eEndoduplicação; ^fFrequência de células aberrantes. DMSO (0,1%) foi utilizado com o controle negativo e a doxorrubicina (0,3µg/mL) serviu como controle positivo. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. **p<0,05 e *p<0,001 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste t de Student.

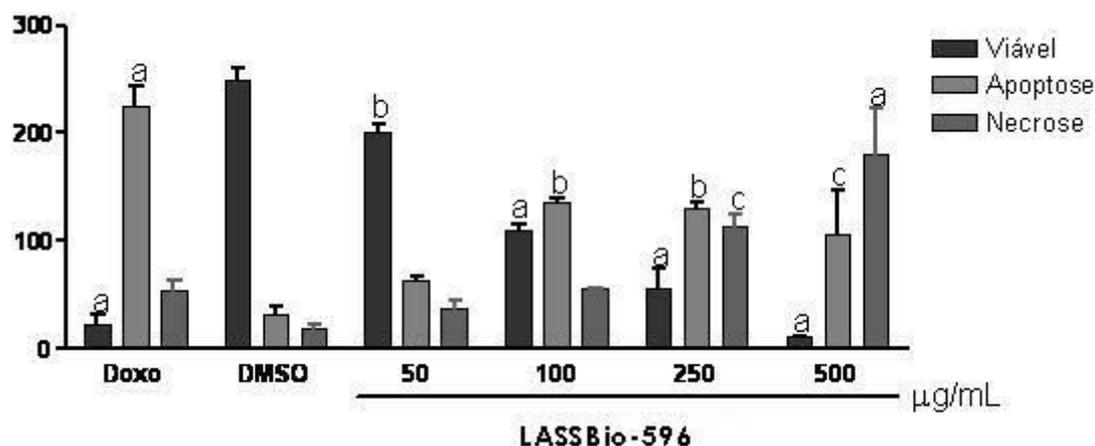


Figura 16. Efeito do composto LASSBio-596 em linfócitos humanos tratados durante 24 horas. DMSO (veículo) e a doxorrubicina (Doxo, 0,3 µg/mL) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

^ap < 0,001; ^bp < 0,01; ^cp < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA/ Student Newman Keuls

9. Comentários finais

O trabalho integrado envolvendo pesquisadores do Sul, Sudeste e Nordeste, iniciado em âmbito do Instituto do Milênio: Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (CNPq# 420015/05-1) permitiu, ao longo dos últimos quatro anos, descobrir um novo candidato a fármaco antiasmático (*i.e.* LASSBio-596), ativo por via oral em modelo murino de asma aguda e asma crônica, com propriedade broncodilatadora, anti-inflamatória e com ações benéficas no processo de remodelamento das vias aéreas, cujo perfis de biodisponibilidade, toxicidade aguda e crônica, em roedores, genotoxicidade e mutagenicidade foram determinados.

LASSBio-596 apresentou ausência de efeito genotóxico e/ou mutagênico – em condições *in vitro*, sem uso de sistema de metabolização exógena – baixa biodisponibilidade e curto tempo de meia-vida, quando administrado pela via oral. Não induziu mortes em roedores nos ensaios de toxicidade aguda (em dose 200 vezes superior a necessária ao efeito antiasmático) e toxicidade crônica (em doses até 25 vezes maior aquela necessária ao efeito antiasmático), embora, alterações histopatológicas e hematológicas pontuais tenham sido observadas com o uso crônico (90 dias consecutivos) de LASSBio-596.

Os estudos pré-clínicos conduzidos com LASSBio-596, até o momento, sugerem futuro alvissareiro a este protótipo aquiral de estrutura simples e original, credenciando a continuidade dos estudos pré-clínicos, que visam o cumprimento das exigências regulatórias, que antecedem a etapa, eventual, de estudos clínicos

de Fase I.

10. Glossário

Biodisponibilidade: parâmetro relacionado com o processo de absorção. Representa a porcentagem da dose que realmente chega ao sangue após a administração do fármaco. Por definição, a dose intravenosa é sempre 100% biodisponível.

Citotoxicidade: capacidade de um agente exercer ação lítica específica sobre certas células.

Depuração: parâmetro relacionado com o processo de eliminação. É o parâmetro que traduz a capacidade do organismo de eliminar o composto administrado. Quanto maior for a capacidade de eliminação, mais frequentemente esse deverá ser administrado para manter as concentrações necessárias para o efeito desejado.

Farmacocinética: subárea da farmacologia que estuda as etapas que o fármaco sofre desde a administração até a eliminação do organismo, ou seja: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).

Genotoxicidade: capacidade de induzir alterações no material genético.

Glicoproteína-P (P-gp): proteína encontrada em algumas membranas do organismo, como no trato gastrointestinal e na barreira hemato-encefálica (BHE), que funciona como uma *bomba de efluxo*, ou seja, promove ativamente a saída de compostos do interior da célula. Desse modo, apenas uma pequena fração desses compostos é absorvido, no caso do intestino,

ou penetra no cérebro, no caso da BHE. O “P” do nome refere-se a permeabilidade. Algumas substâncias, como o verapamil por exemplo, podem inibir essa proteína aumentando a biodisponibilidade de compostos que eram antes pouco absorvidos.

Hiper-responsividade: resposta exagerada das vias aéreas do asmático a uma grande variedade de fatores ambientais, genéticos e estímulos mecânicos.

Meia-vida: parâmetro que indica o tempo necessário para que a concentração do composto no sangue seja reduzida à metade. Esse parâmetro, que depende tanto do volume de distribuição quanto da depuração, é importante para determinar o intervalo entre doses para a administração dos medicamentos.

Mutagenicidade: qualidade de mutagênico. Mutagênico é todo agente físico, químico ou biológico que pode causar mutação, ou seja, um dano na molécula de DNA.

Remodelamento: reconstruir com modificações profundas. Alteração estrutural das vias aéreas como resultado do processo inflamatório crônico na asma.

Simbiótico: protótipo desenhado para atuar em no mínimo dois alvos moleculares, pertencentes a janelas bioquímicas distintas, porém, envolvidos em uma mesma resposta fisiopatológica

Toxicologia: ciência multidisciplinar que tem como objeto de estudo os efeitos adversos das substâncias químicas sobre os organismos.

Volume de distribuição: parâmetro relacionado com o processo de distribuição. É o parâmetro que mostra a afinidade do composto pelos tecidos e órgãos, bem como pelas proteínas do plasma. Quanto maior o volume de distribuição, maior a quantidade do composto nos tecidos e órgãos em comparação com a quantidade no sangue.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR, CNPq/FAPERJ# 573.564/2008-6).

Referências Bibliográficas

- ¹ Barreiro, E. J. *Rev. Virtual Quim.*, **2009**, 1, 26. [Link]
- ² Global Initiative for Asthma (GINA). Disponível em: <<http://www.ginasthma.com>>. Acesso em: 10 julho 2009.
- ³ Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. Disponível em: <<http://www.amrigs.org.br/revista/46-26>>

03/III%20Consenso%20Brasileiro%20no%20Manejo%20da%20Asma%20(2002).pdf>. Acesso em: 10 novembro 2009.

⁴ Souza, M. L. M.; Meneghini, A. C.; Vianna, E. O.; Borges, M. C. J. *Bras. Pneumol.* **2009**, 35, 824. [PubMed]

⁵ Louis, R.; Lau, L. C. K.; Bron, A. O.; Rademercker, M.; Djukanovic, R. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, 161, 9. [PubMed]

⁶ Kay, A. B. *Trends Mol. Med.* **2005**, 11, 148. [CrossRef] [PubMed]

⁷ Bousquet, J.; Chanez, P.; Lacoste, J. Y.; White, R.; Vic, P.; Godard, P.; Michel, F. B. *Allergy* **1992**, 47, 3. [CrossRef][PubMed]

⁸ Bush, A. *Allergol. Int.* **2008**, 57, 11. [CrossRef] [PubMed]

⁹ Holgate, S. T.; Holloway, J.; Wilson, S.; Bucchieri, F.; Puddicombe, S.; Davies, D. E. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2004**, 1, 93. [CrossRef][PubMed]

¹⁰ Kumar, R. K.; Herbert, C.; Thomas, P. S.; Wollin, L.; Beume, R.; Yang, M.; Webb, D. C.; Foster, P. S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307, 349. [CrossRef] [PubMed]

¹¹ Holgate, S. T. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, 120, 1233. [CrossRef]

¹² a) Essayan, D. M. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, 108, 671. [CrossRef] [PubMed]; b) Russo, C.; Polosa, R. *Clin. Sci. (Lond)* **2005**, 109, 135. [CrossRef] [PubMed]; c) Lykouras, D.; Sampsonas, F.; Kaparianos A.; Karkoulas, K.; Spiropoulos, K. *Mini Rev Med Chem.* **2008**, 8, 934. [CrossRef] [PubMed]

¹³ a) Lima, L. M.; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2001; b) Lima, L. M.; Castro, Paulo; Machado, A. L.; Fraga, C. A. M.; Lugnier, C.; Koatz, V. L. G.; Barreiro, E. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3067. [CrossRef]

¹⁴ Lima, L. M.; de Lima, N. M. *Rev. Virtual Quim.*, **2009**, 1, 35. [Link]

¹⁵ Rocco, P. R. M.; Momesso, D.P.; Figueira, R.C.; Ferreira, H.C.; Cadete, R.A.; Légora-Machado, A.; Koatz, V. L. G.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M.; Zin, W. A. *Eur. Respir. J.* **2003**, 22, 20. [PubMed]; b) Barreiro, E. J.; Rocco, P. R. M.; Zin, W. A.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Koatz, V. L. G. **2003** (Patente, # PI0208767-7).

¹⁶ Galhardo, F. P. L.; Martinez, J. A. B. *Medicina, Ribeirão Preto* **2003**, 36, 248. Disponível em:

<<http://www.fmrp.usp.br/revista/2003/36n2e4/10sin-drome-desconforto-respiratorio-agudo.pdf>>. Acesso em: 10 novembro 2009.

¹⁷ Campos, H. S.; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

¹⁸ Barreiro, E. J.; Rocco, P. R. M.; Zin, W. A.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M. **2004** (Patente, # PI0401660-2).

¹⁹ Campos, H. S.; Xisto, D. G.; Oliveira, M. B. C.; Teixeira, I.; Negri, E. M.; Mauad, T.; Carnielli, D.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Faffe, D. S.; Zin, W. A.; Lapa e Silva, J. R.; Rocco, P. R. M. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2006**, *39*, 283. [CrossRef]

²⁰ FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 11 novembro 2009.

²¹ Cattani, V. B.; Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Dalla Costa, T.; *Resumo do 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences*, Ribeirão Preto, Brasil, 2009.

²² Schargel, L.; Wu-Pong, S.; Yu, A. B. C.; *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 5a. ed., McGraw Hill: New York, 2005.

²³ Yu, D.K. *J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *39*, 1203. [PubMed]

²⁴ Balayssac, D.; Cayre, A.; Ling, B.; Maublant, J.; Penault-Llorca, F.; Eschaliier, A.; Coudore, F.; Authier, N. *Chemotherapy* **2008**, *54*, 336. [CrossRef]

²⁵ Triplett, J. W.; Hayden, T. L.; Mcwhorter, L. K.; Gautam, S. R.; Kim, E. E.; Bourne, D. W. A. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 1007. [CrossRef]

²⁶ Hartmann, A.; Speit, G. *Toxicol. Lett.* **1997**, *90*, 183. [CrossRef]

²⁷ Nordenson, I.; Beckman, L.; Lidén, S.; Stjernberg, N. *Hum. Herd.* **1984**, *34*, 76. [CrossRef]

²⁸ McGahon, A. J.; Martin, S. M.; Bissonnette, R. P.; Mahboubi, A.; Shi, Y.; Mogil, R. J.; Nishioka, W. K.; Green, D. R. *Meth. Cell Biol.* **1995**, *46*, 153. [CrossRef]

²⁹ Lovell, D. P.; Thomas, G.; Dubrow, R. *Teratog. Carcinog. Mutag.* **1999**, *19*, 109. [CrossRef]

³⁰ Savage J. R. K. *J. Med. Genet.* **1976**, *13*, 103. [CrossRef] [PubMed]