



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 1013903-6 B1**



**(22) Data do Depósito: 29/04/2010**

**(45) Data de Concessão: 03/03/2020**

---

**(54) Título:** USO DE UM AGENTE ADRENÉRGICO E UM ANTAGONISTA DE ENDOTELINA-A, COMPOSIÇÃO E USO DE CENTAQUINA

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/4025; A61K 31/506; A61K 31/42; A61P 9/12; A61P 7/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 30/04/2009 US 61/174,257.

**(73) Titular(es):** MIDWESTERN UNIVERSITY.

**(72) Inventor(es):** ANIL GULATI.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2010032942 de 29/04/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/127096 de 04/11/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 31/10/2011

**(57) Resumo:** USO DE UM AGENTE ADRENÉRGICO E UM .ANTAGONISTA DE ENDOTELINA-A, COMPOSIÇÃO E USO DE CENTAQUINA Trata-se de métodos para tratamento de hipertensão, dor e choque hemorrágico ressuscitativo com o uso de um agente adrenérgico, como centaquina. Os métodos tratam mamíferos, incluindo seres humanos.

**USO DE UM AGENTE ADRENÉRGICO E UM ANTAGONISTA DE  
ENDOTELINA-A, COMPOSIÇÃO E USO DE CENTAQUINA**

**REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido reivindica o benefício de dados de  
5 depósito do pedido de patente provisória U.S. n°  
61/174.257, depositada em 30 de abril de 2009, incorporado  
nesta invenção por referência integralmente.

**Campo da técnica**

A presente invenção se refere a tratamentos  
10 terapêuticos originais ao utilizar centaquina. Em uma  
modalidade, a centaquina é utilizada em conjunto com um  
antagonista de endotelina no tratamento de hipertensão, em  
uma segunda modalidade, a centaquina é utilizada como um  
analgésico no tratamento de dor. Em uma terceira  
15 modalidade, a centaquina é utilizada no tratamento de  
choque hemorrágico ressuscitativo.

**Antecedentes da técnica**

A hipertensão é uma doença grave que aflige muitas  
pessoas em todo o mundo. É estimado que um em cada três  
20 norte-americanos sofra de pressão alta, até um terço dos  
mesmos desconhece o problema. Além de mudanças no estilo de  
vida como exercício, perda de peso, e reduzir ingestão de  
sal, a maioria das terapias anti-hipertensivas envolve o  
uso de um ou mais fármacos anti-hipertensivos. Além de  
25 diuréticos, bloqueadores de canal de  $Ca^{++}$ , bloqueadores  
adrenérgicos, inibidores ACE, e bloqueadores de receptor  
angiotensina-II, fármacos hipotensivos que agem  
centralmente estão disponíveis para o tratamento de  
hipertensão moderada a grave.

A Clonidina, *N*-(2,6-diclorofenil)-4,5-diidro-1*H*-imidazol-2-amina, é um fármaco anti-hipertensivo largamente utilizado que media seus efeitos hipotensivos por estimulação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  centrais (Kobinger, 1978; Guyenet e abot, 1981). O mesmo tem uma afinidade de ligação aproximadamente 10 vezes mais alta para os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  do que os adrenorreceptores  $\alpha_1$  (U'Prichard et al., 1977). Os fármacos anti-hipertensivos que agem centralmente são utilizados para tratar hipertensão incontrolável e refratária. Entretanto, o uso é limitado devido à ação dupla. Quando administrado, primeiro os mesmos estimulam receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  periféricos que resulta em vasoconstrição e um aumento na pressão sanguínea, e segundo os mesmos agem em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  centrais para inibir impulso simpático que resulta em vasodilatação e uma redução na pressão sanguínea. A ação central predomina sobre a periférica, e logo o efeito geral de clonidina é redução na pressão sanguínea.

A centaquina (2-[2-(4-(3-metifenil)-1-piperazinil)etil-quinolina) é um fármaco anti-hipertensivo que age centralmente. A estrutura da centaquina foi determinada (Bajpai et al., 2000) e a conformação de centaquina foi confirmada por difração de raio-X (Carpy e Saxena, 1991). Embora seja estruturalmente diferente de clonidina, a centaquina produz uma queda na pressão arterial média (MAP) e frequência cardíaca (HR) similar àquela vista com clonidina em gatos e ratos anestesiados (Srimal et al., 1990). Em camundongos, o mesmo tem LD50 de 600 mg/kg

intraperitoneal e produz uma queda dependente de dose em MAP em várias espécies. A centaquina (0,05 a 0,2 mg/kg, iv) produziu uma redução dependente de dose em MAP e HR em ratos anestesiados com uretano. Entretanto, em ratos de cervical seccionada, centaquina administrada intravenosamente não produziu qualquer efeito em MAP ou HR (Gulati et al., 1991a). A administração intratecal de centaquina não produziu qualquer efeito em MAP ou HR (Gulati et al., 1991a). A administração intraduodenal de centaquina (1,0 a 2,5 mg/kg) produziu uma queda de 40 a 50 mmHg em MAP, que não foi afetada pelo pré-tratamento com anti-histamínicos e atropina (Murthi et al., 1976; Srimal et al., 1990). Em ratos espontaneamente hipertensivos, a centaquina (0,5 a 1,0 mg/kg) foi efetiva em reduzir a MAP em 50 a 60 mmHg. A administração repetida de centaquina uma vez por dia por 15 dias não produziu qualquer potenciação ou tolerância (Murthi et al., 1976).

Descobriu-se que a centaquina (0,1, 1,0 e 10,0 µg/ml) produz um aumento inicial seguido por redução de liberação espontânea de norepinefrina (NE) e liberação de norepinefrina inibida evocada por cloreto de potássio e cloreto de dimetil fenil piperazínio que indica que a centaquina inibe liberação de norepinefrina (Bhatnagar et al., 1985). Com administração crônica em ratos, ambas centaquina e clonidina produziram hipotensão e bradicardia associada com um super-regulação em receptores adrenérgicos  $\alpha$  no hipotálamo e medula (Gulati et al., 1991a; Gulati et al., 1991b). É possível que uma redução na liberação de

norepinefrina na sinapse leve a um aumento na densidade de receptores adrenérgicos  $\alpha$ .

A regulação central de pressão sanguínea foi relacionada a um peptídeo endógeno de 21 resíduos, endotelina (ET). ET foi descoberta duas décadas atrás em  
5 células epiteliais arteriais de porcina, e desde então foi reconhecida como um dos vasoconstritores mais potentes (Hickey et al., 1985; Yanagisawa et al., 1988). Há três isopeptídeos estrutural e funcionalmente distintos (ET-I, ET-2, e ET-3), que por sua vez se liga a três diferentes  
10 receptores ( $ET_A$ ,  $ET_{B1}$ , e  $ET_{B2}$ ). Os receptores  $ET_A$  e  $ET_{B2}$  são localizados no músculo vascular liso onde os mesmos produzem vasoconstrição pelo aumento em  $Ca^{++}$  intracelular. Por outro lado, os receptores  $ET_{B1}$  são encontrados no  
15 endotélio vascular onde os mesmos mediam vasorrelaxamento pela síntese e liberação de óxido nítrico e prostaciclina (Sakamoto et al., 1993; Shetty et al., 1993). A administração de ET-1 intravenosamente produz uma alteração difásica dependente de dose na pressão sanguínea, caracterizada por uma breve fase hipotensiva seguida por  
20 uma hipertensão prolongada junto com um aumento em HR (Ouchi et al., 1989; Kuwaki et al., 1990). ET está presente no cérebro, e ET central demonstrou que regula o sistema nervoso simpático (Gulati et al., 1997a; Gulati et al.,  
25 1997b).

Foi anteriormente descoberto que ET pode modificar os efeitos cardiovasculares de clonidina. O pré-tratamento com ET em ratos produziu um efeito antagonista na hipotensão e bradicardia induzida por clonidina. Um mecanismo postulado

é um que ET aumentou a sensibilidade de receptores adrenérgicos  $\alpha$  periféricos, levando à potenciação dos efeitos hipertensivos periféricos de clonidina (Gulati, 1992; Gulati e Srimal, 1993). Estudos mostraram que ET  
5 atenua a resposta de aumento de pressão e liberação de  $[^3\text{H}]$ norepinefrina durante estimulação da artéria mesentérica do rato e a artéria femoral do porquinho da índia, que resulta com isso em inibição pré-sináptica e um subsequente aumento em sinal simpático (Wiklund et al.,  
10 1988; Tabuchi et al., 1989). Portanto, é possível que os efeitos hipotensivo central e bradicárdico de clonidina poderiam ser antagonizados por ET devido à inibição mediada por ET de transmissão neuronal pré-sináptica.

É conhecido que há uma significativa alteração de  
15 parâmetros cardiovasculares induzidos de clonidina por ET e poucos antagonistas ET já no mercado para o tratamento de hipertensão pulmonar e diversos estão em distribuição. O efeito de ET e seus antagonistas em mudanças induzidas por agente anti-hipertensivo adrenérgico em parâmetros  
20 cardiovasculares, portanto, foi estudado. Compostos estruturalmente diferentes de clonidina e centaquina demonstraram ter efeitos similares em pressão sanguínea ao agir em receptores adrenérgicos  $\alpha$  centrais e periféricos. Os inventores, portanto, exploraram o envolvimento de ET na  
25 modulação de efeitos adrenérgicos periféricos de clonidina e centaquina. Os estudo foi conduzido em ratos ao utilizar agonista ET (ET-1) e antagonistas (BMS-182874 (antagonista específico de  $\text{ET}_A$ ) e TAK-044 (antagonista não específico de

ET<sub>A/B</sub>) para investigar seu efeito em mudanças induzidas de clonidina e centaquina em MAP, pressão de pulso (PP), e HR.

Analgésicos são agentes que aliviam dor ao agir centralmente para elevar limiar de dor, preferivelmente sem perturbar a consciência ou alterar outras funções sensoriais. Um mecanismo pelo qual fármacos analgésicos diminuem dor (isto é, aumentam limiar de dor) foi formulado.

O National Center for Health Statistics (2006) estima que mais de um quarto dos norte-americanos (26%) acima de 20 anos, e mais de 76,5 milhões de norte-americanos, relatam ter tido um problema com dor de qualquer natureza que persistiu por mais do que 24 horas e mais 191 milhões eventos de dor aguda ocorreram nos Estados Unidos. Os opioides são os analgésicos mais comumente utilizados para o gerenciamento clínico de dor aguda e crônica. Há vários efeitos colaterais associados com o uso prolongado de opioides que inclui o desenvolvimento de tolerância, que resulta em alívio inadequado da dor. Há diversos regimes existentes projetados para aprimorar analgesia e gerenciar efetivamente a dor, que inclui fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDS), opioides adicionais, e não opioides em combinação com terapia de opioide. Embora estas abordagens forneçam alívio sintomático, os mesmos têm pouco efeito nos mecanismos subjacentes que contribuem para o desenvolvimento de tolerância e representam um significativo risco de toxicidade, dependência, e vício.

Logo, existe uma necessidade na técnica para identificar agentes, ou combinações de agentes que reduzem

tolerância a analgésicos opioides e reduzem sintomas de dor, e que podem agir como analgésicos não opioides efetivos.

#### Sumário da técnica

5 A presente invenção é direcionada à administração de um antagonista de endotelina em combinação com centaquina ou outros agentes adrenérgicos para um indivíduo em necessidade dos mesmos. Em particular, a administração de centaquina ou outros agentes adrenérgicos em combinação com  
10 um antagonista de endotelina potencializa o efeito anti-hipertensivo da centaquina.

Os agentes adrenérgicos úteis de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, centaquina, clonidina, guanfacina, guanabenz, guanoxbenz, metildopa,  
15 prazosina, tamsulosina, doxazosina, terazosina, fentolamina, fenoxibenzamina, mirtazapina, e misturas dos mesmos. O agente adrenérgico é administrado em conjunto com um antagonista de endotelina no tratamento de hipertensão. Os agentes adrenérgicos podem ser administrados  
20 individualmente ou em qualquer combinação, junto com um ou mais antagonista de endotelina para tratar hipertensão.

Outro aspecto da presente invenção é a administração de centaquina a um indivíduo em necessidade do mesmo como um analgésico para tratar dor. Em outro aspecto da presente  
25 invenção, a centaquina é coadministrada com um analgésico opiáceo a um indivíduo em necessidade do mesmo em um tratamento para dor.



Ainda outro aspecto da presente invenção é administração de centaquina a um indivíduo em necessidade do mesmo para tratar choque hemorrágico ressuscitativo.

Ainda outro aspecto da presente invenção é fornecer um  
5 artigo de fabricação para uso farmacêutico humano que compreende (a) um encarte de embalagem, (b) um contêiner, e (c1) uma composição embalada que compreende centaquina ou (c2) uma composição embalada que compreende um antagonista de endotelina e uma composição embalada que compreende  
10 centaquina. O encarte de embalagem inclui instruções para tratar dor ou choque hemorrágico ressuscitativo (c1) ou para tratar hipertensão (c2).

Estes e outros aspectos da presente invenção tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada  
15 das modalidades preferidas da invenção.

#### Breve descrição das figuras

A Figura 1 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para  
20 administração de 10, 30, e 90 µg/kg de clonidina a ratos;

A Figura 2 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de clonidina (10 µg/kg) sozinha e com 100,  
25 300, ou 900 µg/kg de ET-1;

A Figura 3 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para

administração de clonidina (10 µg/kg) e com TAK-044 ou BMS-182874;

A Figura 4 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de clonidina (10 µg/kg) sozinha e com ET-1, prazosina, e centaquina ou clonidina;

A Figura 5 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de 0,05, 0,15, e 0,45 mg/kg de centaquina;

A Figura 6 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de centaquina (0,15 mg/kg) sozinha e com 100, 300, e 900 mg/kg de ET-1;

A Figura 7 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de centaquina (0,15 mg/kg) sozinha e com TAK-044 ou BMS 182874;

A Figura 8 contém gráficos de Pressão Sanguínea Média (mmHz) vs. tempo (min), Pressão de Pulso (mmHz) vs. tempo (min), e Frequência Cardíaca (batidas/min) para administração de centaquina (0,15 mg/kg) sozinha ou com ET-1 (300 mg/kg) e prazosina (0,1 mg/kg);

A Figura 9 contém gráficos de latência de retirada de cauda (segundo) vs. tempo (min) para veículo e centaquina (0,1, 0,3, ou 0,9 mg/kg);

A Figura 10 contém gráficos de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) vs. tempo (min) para ratos tratados com veículo, centaquina, morfina, ou centaquina e morfina;

As Figuras 11 a 13 contém gráficos de latência de retirada de cauda (segundo) vs. tempo (min) para ratos tratados com veículo, centaquina, morfina, ou centaquina e morfina;

A Figura 14A contém um imunotransferência que mostra expressão de receptor  $\text{ET}_A$  em cérebro de rato após 1 hora de tratamento com centaquina;

A Figura 14B contém gráficos de barra de mudança de dobra na expressão de receptor  $\text{ET}_A$  normalizado em  $\beta$ -actina, como avaliado por densitometria;

A Figura 15 contém gráficos de lactato de sangue (mmol/L) vs. tempo (min) em ratos ressuscitados com lactato de Ringer sozinho ou com centaquina no modelo de choque hemorrágico;

A Figura 16 contém gráficos de déficit de base padrão (mEq/L) vs. tempo (min) em ratos ressuscitados com lactato de Ringer sozinho ou com centaquina no modelo de choque hemorrágico;

A Figura 17 contém gráficos de barra que mostra tempo de sobrevivência (min) em ratos ressuscitados com lactato de Ringer sozinho ou com centaquina no modelo de choque hemorrágico;

As Figuras 18 e 19 contém ciclos de pressão-volume para ratos ressuscitados com lactato de Ringer; e

Figura 20 contém ciclos de pressão-volume para ratos ressuscitados com lactato de Ringer e centaquina.

### Descrição detalhada das modalidades preferidas

A presente invenção é direcionada à administração de centaquina ou outros agentes adrenérgicos e um antagonista de endotelina para tratar hipertensão. A presente invenção  
5 também é direcionada à administração de centaquina para tratar dor ou choque hemorrágico ressuscitativo.

Os métodos descritos nesta invenção se beneficiam do uso de um agente adrenérgico, como centaquina, e um antagonista de endotelina no tratamento de hipertensão. O  
10 agente adrenérgico e o antagonista de endotelina pode ser administrado ao mesmo tempo ou sequencialmente para atingir o efeito desejado.

Para os propósitos da invenção revelados nesta invenção, o termo "tratamento" inclui baixar, atenuar, ou  
15 eliminar dor, hipertensão, ou choque hemorrágico ressuscitativo, e sintomas associados de cada condição. Como tal, o termo "tratamento" inclui administração terapêutica médica e, nenhum tratamento de dor, uma administração profilática.

20 O termo "contêiner" significa qualquer receptáculo e fechamento, portanto adequado par armazenar, remessa, distribuição, e/ou manuseio de um produto farmacêutico.

O termo "encarte" significa informações que acompanham um produto que fornece uma descrição de como administrar o  
25 produto, junto com os dados de segurança e de eficácia exigidos para permitir que o médico, farmacêutico, e paciente tomem uma decisão informada com relação ao uso do produto. O encarte de embalagem geralmente é referido como o "rótulo" por um produto farmacêutico.

O termo "agente adrenérgico" significa um composto que estimula o sistema nervoso simpático, por exemplo, que imita os efeitos de norepinefrina e epinefrina. Como utilizado nesta invenção, o termo "agente adrenérgico" é singular ou plural.

ET é um fator de vasoconstrição derivado de endotélio extremamente potente (Hickey et al., 1985) que foi isolado, sequenciado, e clonado (Yanagisawa et al., 1988). As endotelinas são peptídeos vasoconstritores altamente potentes de 21 aminoácidos com duas ligações dissulfeto. As endotelinas são produzidas biologicamente ao clivar enzimaticamente preproendotelina em proendotelina, então em endotelina por enzimas conversoras de endotelina. ET exerce efeitos biológicos ao se ligar a receptores de superfície de célula, que são 7 receptores de transmembrana acoplados a G-proteínas. Há dois tipos distintos de receptores de endotelina: (a) os receptores ET<sub>A</sub> seletivos de ET-1 primariamente encontrado em músculo vascular liso e responsável por vasoconstrição, e (b) receptores ET<sub>B</sub> não seletivos primariamente encontrados em endotélio vascular e responsável por vasodilatação.

Os efeitos vasoconstritores de ET-1 são mediados predominantemente por G-proteína acoplada a receptores ET<sub>A</sub>. ET-1 também é produzido em altas concentrações pela próstata, cânceres metastáticos, e SNC. ET no SNC é produzido por células endoteliais e células não endoteliais, como neurônios, astrócitos, e células gliais.

A distribuição global de ET e seus sítios de ligação no cérebro sugerem que, além de ser um vasoconstritor, o

mesmo pode estar agindo como um importante neuropeptídeo no SNC (Gulati et al., 1992). Os antagonistas receptores de endotelina (ET), em particular ET<sub>A</sub> seletivo ou antagonistas balanceados ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, representam uma área terapêutica para 5 doenças como insuficiência cardíaca congestiva (CHF) e hipertensão pulmonar. BQ- 123 e BMS-182874 são antagonistas específicos de receptores ET<sub>A</sub> (Stein et al., 1994). Os antagonistas de endotelina têm efeitos profundos na nos vasos sanguíneos pulmonares e no coração direito, em que 10 inibidores ACE afetam primariamente o vaso periférico e o coração esquerdo.

Diversos estudos indicam que os receptores ET centrais são predominantemente do subtipo ET<sub>B</sub>. Os astrócitos cerebrais de rato demonstraram expressar majoritariamente o 15 tipo ET<sub>B</sub> de receptores e células gliais também demonstraram expressar intensamente receptor ET<sub>B</sub> de mRNA. Entretanto, a administração central de um agonista receptor ET<sub>B</sub> altamente seletivo, IRL-1620, não produz qualquer efeito no sistema cardiovascular, e os efeitos circulatórios sistêmicos e 20 regionais de ET-1 centralmente administrado demonstraram ser mediados através dos receptores ET<sub>A</sub> (Gulati et al., 1995; Rebello et al., 1995).

A administração intracerebroventricular de ET-1 produz uma aumento temporário seguido por queda prolongada na 25 pressão sanguínea arterial média (BP). O efeito pressor foi acompanhado por um aumento em atividade nervosa simpática renal e níveis de plasma de catecolaminas e arginina-vasopressina.

O mesmo também demonstrou que os efeitos de administração central de ET-1 são mediados através de ativação do sistema nervoso simpático porque estes efeitos foram atenuados por bloqueadores de gânglio. A administração intracisternal de ET-1 provocou um aumento temporário em BP, atividade nervosa simpática renal, e atividade nervosa frênica. Uma subsequente queda em BP foi acompanhada por uma redução em atividade nervosa simpática renal e atividade nervosa frênica. A observação que ET-1 central induzida aumenta em resposta pressor foi suprimida por pré-tratamento com fenoxibenzamina (Ouchi et al., 1989) implica ainda na participação ativa do sistema nervoso simpático na fase inicial pressora.

Um antagonista de endotelina utilizado na presente invenção pode ser qualquer dos antagonistas receptores de endotelina conhecido na técnica. Como utilizado nesta invenção, o termo "antagonista receptor de endotelina" e "antagonista de endotelina" são sinônimos e são utilizados alternadamente, e se referem à administração de um ou mais dos antagonistas. A endotelina é um potente vasoconstritor. Os antagonistas de endotelina são utilizados para tratar insuficiência cardíaca agudo, insuficiência cardíaca congestiva/crônico, hipertensão arterial pulmonar, edema pulmonar, hemorragia subaracnoide, doença pulmonar obstrutiva crônica, infarto do miocárdio, isquemia cerebral aguda, síndromes coronarianas agudas, insuficiência renal aguda, tratamento pós-operatório em operações de fígado, e câncer de próstata. Nenhum efeito adverso é esperado quando a um paciente é administrado um antagonista de endotelina.

Os antagonistas de ET preferidos são antagonistas seletivos para receptores de endotelina A (ET<sub>A</sub>) ou são antagonistas de ET<sub>A</sub>/endotelina B (ET<sub>B</sub>) balanceados. Tais antagonistas de ET são estabelecidos nos Apêndices A e B  
5 nesta invenção. Entretanto, os antagonistas de endotelina B e antagonistas de endotelina diversos, como estabelecidos nos Apêndices C e D nesta invenção, também podem ser utilizados em uma composição ou método da presente invenção. Os antagonistas de endotelina adicionais úteis  
10 podem ser encontrados em Pedidos de Publicação de Patente U.S. nº US 2002/0082285 e US 2003/0232787, e em Wu, Patentes Exp. Opin. Ther. (2000), 10(11), páginas 1653 a 1668, cada um incorporada nesta invenção por referência integralmente.

15 Exemplos específicos de antagonistas de endotelina útil na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, atrasentano, tezosentano, bosentano, sitaxsentano, enrasentano, BMS-207940 (Bristol-Myers Squibb), BMS-193884, BMS-182874, J-104132 (Banyu Pharmaceutical), VML 588/Ro 61-  
20 1790 (Vanguard Medica), T-0115 (Tanabe Seiyaku), TAK-044 (Takeda), BQ-788, BQ123, YM-598, LU 135252, PD 145065, A-127722, ABT-627, A-192621, A-182086, TBC3711, BSF208075, S-0139, TBC2576, TBC3214, PD156707, PD180988, ABT-546, ABT-627, Z1611, RPR118031A, SB247083, SB217242, S-Lu302872,  
25 TPC10950, SB209670, e misturas do mesmo.

O BQ 123 é um antagonista específico de endotelina A, e é o sal de sódio de ciclo(-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-). BQ-788 é um antagonista específico de endotelina B, e é o sal de sódio de N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gama-



metilleucil-D-1-methoxycarbonil triptofanil-DNIE (ver Proc. Natl. Acad. Sd. EUA, 91, páginas 4892 a 4896 (1994)).

Além de um antagonista convencional de endotelina, um composto que inibe a formação de endotelina endógena também pode ser utilizado como o antagonista de endotelina na presente invenção. Tais compostos são úteis porque impedem formação de endotelina, e, portanto, reduzem a atividade de receptores de endotelina. Uma classe de tais compostos são os inibidores de enzima conversora de endotelina (ECE).

Os inibidores de ECE úteis incluem, mas não estão limitados a, CGS34225 (isto é, N-((1-((2(S)-(acetiltio)-1-oxopentil)-amino)-1-ciclopentil)-carbonil-S-4-fenilfenil-alanina metil éster) e fosforamidona (isto é, N-(a-ranopiranosiloxihidroxifosfinil)-Leu-Trp).

Testes foram conduzidos para ilustrar os efeitos de um antagonista de endotelina em um agente adrenérgico, como clonidina e centaquina, administrados a um mamífero, que inclui humanos. Testes também foram conduzidos para ilustrar os efeitos de centaquina em analgesia e choque hemorrágico ressuscitativo.

Os testes e dados mostram que uma combinação de um agente adrenérgico, como centaquina ou clonidina, e um antagonista de endotelina pode ser administrado a mamíferos em métodos para tratar hipertensão. Os testes e dados também mostram que centaquina pode ser administrado a mamíferos, sozinha ou com um analgésico opiáceo, em métodos para tratar dor, e em métodos para tratar choque hemorrágico ressuscitativo. O agente adrenérgico e antagonista de endotelina, ou a centaquina sozinha, pode

ser formulada em excipientes adequados para administração oral, ou para administração parenteral. Tais excipientes são bem conhecidos na técnica. Os agentes ativos (por exemplo, centaquina e, em algumas modalidades, um antagonista de endotelina e agente adrenérgico) estão tipicamente presentes em tal composição em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 75% em peso, seja sozinha ou em combinação.

Para cada uma das modalidades reveladas nesta invenção, composições farmacêuticas que contêm os agentes ativos da presente invenção são adequados para administração a humanos ou outros mamíferos. De forma típica, as composições farmacêuticas são estéreis, e não contêm compostos tóxicos, carcinogênicos, ou mutagênicos que poderiam causar uma reação adversa quando administradas.

O método da invenção pode ser executado ao utilizar os agentes ativos como descrito acima, ou como um sal fisiologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Os agentes ativos, sais, ou solvatos podem ser administrados como os compostos puros, ou como uma composição farmacêutica que contém uma ou ambas as entidades.

Os agentes ativos podem ser administrados por qualquer via adequada, por exemplo administração oral, bucal, inalação, sublingual, retal, vaginal, intracisternal através de punção lombar, transuretral, nasal, percutânea, isto é, transdermal, ou parenteral (que inclui intravenosa, intramuscular, subcutânea, e intracoronária). A administração parenteral pode ser executada ao utilizar uma

agulha e seringa, ou ao utilizar uma técnica de alta pressão, como POWDERJECT™. Uma administração dos agentes ativos pode ser realizada antes, durante, ou após o início da dor.

5       As composições farmacêuticas incluem aquelas em que os ingredientes ativos são administrados em uma quantidade efetiva par atingir seu propósito pretendido. Mais especificamente, uma "quantidade terapeuticamente efetiva" significa uma quantidade efetiva para eliminar ou aliviar  
10   dor ou hipertensão. A determinação de uma quantidade terapeuticamente efetiva está dentro da capacidade daqueles versados na técnica, especialmente à luz da revelação detalhada fornecida nesta invenção.

      Uma "dose terapeuticamente efetiva" se refere à  
15   quantidade dos agentes ativos que resulta em alcançar o efeito desejado. A toxicidade e eficácia terapêutica de tais agentes ativos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos em culturas de célula ou animais experimentais, por exemplo, determinar a LD<sub>50</sub> (a  
20   dose letal a 50% da população) e a ED<sub>50</sub> (a dose terapeuticamente efetiva em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxico e terapêutico é o índice terapêutico, que é expresso como a razão entre LD<sub>50</sub> e ED<sub>50</sub>. Um alto índice terapêutico é preferido. Os dados obtidos a  
25   partir de tais dados podem ser utilizados para formular uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem dos agentes ativos preferivelmente fica dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED<sub>50</sub> com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta

faixa dependendo da forma de dosagem empregada, e a via de administração utilizada.

A formulação exata, via de administração, e dosagem é determinada por um médico do indivíduo em vista da condição do paciente. As quantidades e intervalos de dosagem podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis de agentes ativos que são suficientes para manter efeitos terapêuticos.

A quantidade de agentes ativos administrados é dependente do sujeito sendo tratado, do peso do sujeito, a gravidade da afecção, a maneira de administração, e o julgamento do médico ao prescrever.

De forma específica, para administração a um humano no tratamento curativo de hipertensão, dosagens orais do agente adrenérgico e do antagonista de endotelina, individualmente em geral são cerca de 0,01 a cerca de 200 mg diariamente para um paciente adulto médio (70 kg), tipicamente dividido em duas a três doses por dia. Logo, para um paciente adulto típico, tabletes individuais ou cápsulas contêm cerca de 0,1 a cerca de 200 mg de centaquina e cerca de 0,1 a cerca de 50 mg antagonista de endotelina, em um adequado veículo farmacêuticamente aceitável ou carreador, para administração em doses únicas ou múltiplas, uma vez ou diversas vezes por dia. As dosagens para administração intravenosa, bucal, ou sublingual são tipicamente cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg por dose única como exigido. Na prática, o médico determina regime de dosagem corrente que é mais adequado para um paciente individual, e a dosagem varia com a idade, peso, e

resposta do paciente em particular. As dosagens acima são exemplificativas do caso médio, mas pode haver ocorrências individuais nas quais dosagens maiores ou menores são consideradas, e tais estão dentro do escopo desta invenção.

5 Os agentes ativos da presente invenção podem ser administrados sozinhos, ou em mistura por adição com um carreador farmacêutico selecionado com relação à via de administração pretendida e prática farmacêutica comum. As composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente  
10 invenção logo pode ser formulada de uma maneira convencional ao utilizar um ou mais carreadores fisiologicamente aceitáveis que compreende excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos agentes ativos em preparações que podem ser utilizadas farmaceuticamente.

15 Estas composições farmacêuticas podem ser fabricadas de uma maneira convencional, por exemplo, por mistura convencional, dissolução, granulação, produção de drágea, emulsificação, encapsulamento, aprisionamento, ou processos liofilizantes. A formulação apropriada é dependente da via  
20 de administração escolhida. Quando uma quantidade terapeuticamente efetiva dos agentes ativos é administrada oralmente, a composição tipicamente está na forma de um tablete, cápsula, pó, solução, ou elixir. Quando administrado em forma de tablete, a composição pode  
25 adicionalmente conter um carreador sólido, como uma gelatina ou um adjuvante. A tablete, cápsula, e pó contêm cerca de 5% a cerca de 95% de um agente ativo da presente invenção, e preferivelmente a partir de cerca de 25% a cerca de 90% de um agente ativo da presente invenção.

Quando administrado em forma líquida, um carreador líquido, como água, petróleo, ou óleos de origem animal ou vegetal, pode ser adicionado. A forma líquida da composição pode conter ainda solução fisiológica salina, dextrose ou outras  
5 soluções de sacarídeo, ou glicóis. Quando administrado em forma líquida, a composição contém cerca de 0,5% a cerca de 90% em peso de agentes ativos, e preferivelmente cerca de 1% a cerca de 50% de um agente ativo.

Quando uma quantidade terapeuticamente efetiva dos  
10 agentes ativos é administrada por injeção intravenosa, cutânea, ou subcutânea, a composição está na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável livre de pirogênio. A preparação de tais soluções parenteralmente aceitáveis, com relação ao pH, isotonicidade, estabilidade,  
15 e similares, está dentro da habilidade na técnica. Uma composição preferida para injeção intravenosa, cutânea, ou subcutânea tipicamente contém, além de um composto da presente invenção, um veículo isotônico.

Os agentes ativos adequados podem ser prontamente  
20 combinados com carreadores farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Tais carreadores capacitam os agentes ativos a serem formulados como tabletes, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, lamas, suspensões e similares, para ingestão oral por um paciente  
25 a ser tratado. As preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas ao adicionar os agentes ativos com um excipiente sólido, opcionalmente triturar a mistura resultante, e processar a mistura de grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter

tabletes ou núcleos de drágea. Os excipientes adequados incluem, por exemplo, reforços e preparações de celulose. Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados.

Os agentes ativos podem ser formulados para  
5 administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem única, por exemplo, em ampolas ou em contêineres de doses múltiplas, com um conservante adicionado. As composições  
10 podem tomar tais formas como suspensões, soluções, ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formulatórios, como agentes de suspensão, estabilizantes, e/ou dispersantes.

As composições farmacêuticas para administração  
15 parenterais incluem soluções aquosas do agente ativo em forma solúvel em água. De forma adicional, as suspensões dos agentes ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Os solventes lipofílicos adequados ou veículos incluem óleos graxos ou ésteres  
20 sintéticos de ácido graxo. As suspensões aquosas de injeção podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão. De forma opcional, a suspensão também pode conter adequado estabilizantes ou agentes que aumentam a solubilidade dos compostos e permitem a preparação de  
25 soluções altamente concentradas. De forma alternativa, uma composição presente pode ser em forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirogênio, antes de uso.

Os agentes ativos também podem ser formulados em composições retais, como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, que contém base convencional se supositório. Além das formulações descritas anteriormente, 5 os agentes ativos também podem ser formulados como uma preparação de deposição. Tais formulações de ação prolongada podem ser administradas por implantação (por exemplo, subcutânea ou intramuscularmente) ou por injeção intramuscular. Logo, por exemplo, os agentes ativos podem 10 ser formulados com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca de íon, ou como derivados esparsamente solúveis, por exemplo, como um sal esparsamente solúvel.

15 Em particular, os agentes ativos pode ser administrado oralmente, bucalmente, ou sublingualmente na forma de tabletes que contêm excipientes, como amido ou lactose, ou em cápsulas ou óvulos, seja sozinhos ou em mistura por adição com excipientes, ou na forma de elixires ou 20 suspensões que contêm agentes aromatizante ou colorante. Tais preparações líquidas podem ser preparadas com aditivos farmacêuticamente aceitáveis, como agentes de suspensão. Um agente ativo também pode ser injetado parenteralmente, por exemplo, intravenosamente, intramuscularmente, 25 subcutaneamente, intratecalmente, intracisternalmente, ou intracoronariamente. Para administração parenteral, o agente ativo é mais bem utilizado na forma de uma solução aquosa estéril que pode conter outras substâncias, por



exemplo, sais, ou monossacarídeos, como manitol ou glicose, para tornar a solução isotônica com sangue.

Para uso veterinário, os agentes ativos são administrado como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal. O veterinário pode determine prontamente o regime de dosagem e via de administração que é mais apropriada para um animal particular.

#### **Agentes adrenérgicos como agentes anti-hipertensivos que agem centralmente**

A clonidina é um agente anti-hipertensivo que age através de central receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  para baixar a pressão arterial média (MAP), mas também age em receptores adrenérgicos periféricos  $\alpha$  ( $\alpha$ -ARs) para produzir vasoconstrição. A endotelina (ET) demonstrou modular a ação de receptores adrenérgicos periféricos. Os testes presente mostram o envolvimento de ET nos efeitos cardiovasculares de clonidina e centaquina. A clonidina (10, 30, e 90  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.) produziu uma queda dependente de dose na pressão arterial média (MAP), pressão de pulso (PP), e uma redução em frequência cardíaca (HR). O tratamento com ET-1 (100, 300 e 900  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.), atenuou significativamente queda induzida por clonidina (10  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.) em MAP de uma maneira dependente de dose. Em ratos tratados com uma alta dose de ET-1 (900  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.) clonidina produziu 42,58% de aumento em MAP comparado com ratos não tratados. A clonidina (10  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.) produziu 37,42% de aumento em HR em ratos tratados com ET-1 (900  $\mu\text{g/kg}$ , i.v.) comparado com ratos não tratados. Um antagonista de  $\text{ET}_{\text{A/B}}$ , TAK-044 (1

mg/kg, i.v.), e um antagonista de ET<sub>A</sub>, BMS-182874 (9 mg/kg, i.v.), potencializou o efeito hipotensivo de clonidina em 17,68% e 4,81%, respectivamente, comparado a ratos não tratados.

5        A interação de ET com centaquina também foi estudada, que produz um queda em MAP similar à clonidina. A centaquina (0,05, 0,15, e 0,45 mg/kg, i.v.) produziu um queda dependente de dose em MAP, e uma redução em HR. A mesma não afetou pH de sangue arterial, pO<sub>2</sub>, e pCO<sub>2</sub>. Nenhum  
10 dos níveis de plasma de ET-1 foi alterado. O tratamento com ET-1 (100, 300, e 900 mg/kg) atenuou significativamente queda induzida por centaquina (0,15 mg/kg, i.v.) em MAP de uma maneira dependente de dose. Em ratos tratados com 900  
15 mg/kg dose de ET-1, a centaquina produziu 33,48% de aumento em MAP comparado a ratos não tratados. A centaquina produziu 21,44% de aumento em HR em ratos tratados com ET-1 comparado a ratos não tratados. O efeito hipotensivo de centaquina foi significativamente potencializado em ratos tratados com TAK-044 (1 mg/kg) em 16,48% ou BMS-182874 (9  
20 mg/kg) em 30,67% comparado a ratos não tratados. A bradicardia induzida por centaquina foi significativamente potencializada em ratos tratados com TAK-044 em 12,74% ou BMS-182874 em 29,00% comparado a ratos não tratados.

25        O pré-tratamento com prazosina, um antagonista de receptor adrenérgico  $\alpha_1$ , (0,1 mg/kg, i.v.) bloqueou completamente mudanças induzidas por ET-1 em efeitos cardiovasculares de clonidina, assim como centaquina. Foi concluído, portanto, que ET modula os efeitos de receptores adrenérgicos vasculares que levam a alterações nos efeitos

cardiovasculares de clonidina e centaquina. Esta é a primeira mostra de que antagonistas de ET podem potencializar os efeitos anti-hipertensivos de clonidina e centaquina, isto é, um agente adrenérgico, ao aumentar a  
5 responsividade de receptores adrenérgicos vasculares ao efeito constritor de centaquina. Uma combinação de antagonista de ET com clonidina ou centaquina, ou outro agente adrenérgico, portanto é uma opção útil para tratar hipertensão.

## 10        **Materiais e métodos**

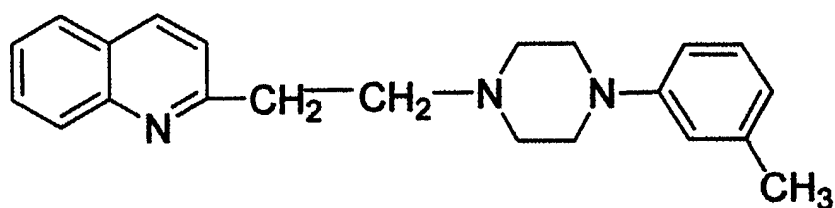
### *Animais*

Ratos Sprague-Dawley machos pesando 250 a 300 g (Harlan, Indianapolis, IN) foram encerrados por pelo menos 4 dias antes de serem utilizados em uma sala com  
15 temperatura controlada ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $50 \pm 10\%$ ) e luz (6:00 da manhã até 6:00 da tarde). Alimento e água foram disponibilizados continuamente. Cuidado animal e uso em procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado e uso animal. Todos os  
20 procedimentos anestésicos e cirúrgicos estiveram em consonância com as normas estabelecidas pelo Comitê de Cuidado Animal.

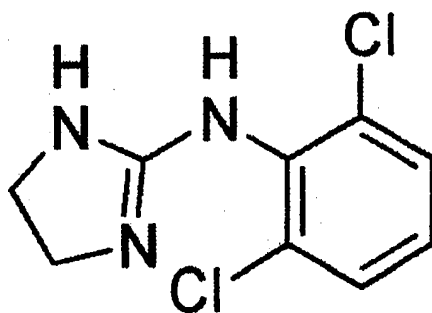
### *Fármacos e substâncias químicas*

Centaquina: 2-[2-(4-(3-metifenil)-1-piperazinil) etil-quinolina (Central Drug Research Institute, Lucknow,  
25 Índia), clonidina, prazosina, uretano (Sigma-Aldrich St Louis, MO, EUA), hidrocloreto de BMS-182874: (5-Dimetilamino)-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1-naftaleno hidrocloreto de sulfonamida) um antagonista específico de

ET<sub>A</sub> (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA); TAK-044:  
 ciclo [D-α-aspartil-3-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-L-  
 alanil-L-α-aspartil-D-2-(2-tienil) sal de glicil-L-leu-Cil-  
 D-triptofilj dissódio) um antagonista não específico de ET<sub>A/B</sub>  
 5 (Takeda Chemical Industries, Osaka, Japão), Endotelina-1  
 (Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA), Kit  
 de Ensaio Imunométrico de Enzima Endotelina-1 (EIA) (nº de  
 Catálogo 900-020A, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI,  
 EUA). Outros reagentes utilizados foram do maior grau  
 10 comercialmente disponível.



Centaquina



Clonidina

#### Determinação de resposta cardiovascular de fármacos em ratos anestesiados

Os ratos foram anestesiados com uretano (1,5 g/kg  
 20 i.p.) e preparados para determinação de parâmetros  
 hemodinâmicos (Gulati e Srimal, 1993; Gulati et al.,

1997b). Os ratos anestesiado foram raspados e imobilizados para preparar para canulação. Uma incisão de 2 a 3 cm foi realizada acima da veia e da artéria femoral, e os vasos foram dissecados e limpos. A veia femoral foi canulada (tubagem PE-50, Clay Adams, Parsipanny, NJ) e seguras por administração de fármaco. Uma ultraminiatura de transdutor de pressão SPR-320 (2F Poliuretano), com um único lado sensor de pressão montados na ponta (Millar Instruments, Houston, TX), foi inserida na artéria femoral esquerda para captar os sinais hemodinâmicos. O transdutor de pressão foi conectado ao amplificador de ponte (ML221 Bridge Amp; AD Instruments, Mountain View, CA, EUA) com conector Viking (AEC-IOC) e os sinais foram captados continuamente a uma taxa de amostragem de  $1000\text{ S}^{-1}$  ao utilizar sistema de aquisição de dados Millar PowerLab 16/30 (AD Instruments, Mountain View, CA, EUA). MAP, HR, e PP foram determinados e analisados com programa de software LabChart-5.00 (Millar Instruments). Após o experimento ser finalizado, os animais foram sacrificados com alta dose de uretano (3 mg/kg).

#### **Determinação de nível de ET-I em plasma de rato**

A fim de analisar a alteração no nível de ET-I, amostras de sangue foram retiradas após tratamento de fármaco através da artéria femoral direita dos ratos anestesiados antes e 1 hora após o tratamento de fármaco e foram coletadas em tubos EDTA resfriados (1 mg/ml de sangue) contendo aprotinina (500 KIU/ml de sangue). As amostras de sangue foram centrifugadas a  $1.600 \times g$  por 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  e o plasma separado foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até ser analisado. O nível de ET-I foi estimado com uso do

Equipamento de Ensaio Imunométrico de Enzima Endotelina-1 do Projeto do Ensaio (Nowicki et al., 2005; Brondani et al., 2007). Brevemente, as amostras de plasma e padrões foram adicionadas a poços revestidos com um anticorpo monoclonal específico para ET-I. A placa então foi lavada após 24 horas de incubação, deixando somente ET-I de ligação na placa. Uma solução de anticorpo monoclonal marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) para ET-I foi então adicionada ao ET-I capturado na placa. A placa foi incubada por 30 min, então lavada para remover o excesso de anticorpo marcado com HRP. Uma solução de substrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada, que gera uma cor azul quando catalisada pela HRP. Ácido clorídrico (IN) foi adicionado, para parar a reação do substrato, e a cor amarela resultante foi lida em 450 nm com uso do detector DTX 800 Multimode. Os dados foram analisados com o Multimode Detection Software (Beckman Coulter, Inc., Harbor Boulevard, Fullerton, CA, EUA). A densidade óptica medida é diretamente proporcional à concentração de ET-I.

#### **Análise de gás sanguíneo**

O pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , e lactato de sangue arterial foram monitorados antes e após a administração do fármaco. As amostras de sangue foram extraídas da cânula arterial com uso de seringas de amostragem de gás sanguíneo (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) e analisadas com uso de uma unidade GEM Premier 3000 (Instrument Laboratory, Lexington, MA, EUA).

### Determinação de resposta de clonidina no arco aórtico abdominal

A aorta abdominal foi isolada e dissecada de ratos anestesiados por uretano ( $1,5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.p.) e foi transferida para tampão de bicarbonato Krebs pH 7,4 (composição em mM, NaCl, 112,0; KCl, 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2;  $\text{MgSO}_4$ , 1,2;  $\text{CaCl}_2$ , 2,5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25,0; glicose, 11,0) com fornecimento contínuo de 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . O tecido foi cortado em segmentos de anel (3 mm de comprimento) e montado em banhos de órgão com uso de suportes de anel de vidro Radnoti de 10 mm. Cuidado extra foi tomado enquanto se cortou e montou o segmento de anel para prevenir a perda de camada endotelial. O tecido foi equilibrado por 45 min por aplicação de 2 g de tensão com alteração de tampão regular a cada 15 min. Os vasos foram pré-contráídos com 100 mM de KCl para determinar a viabilidade. As contrações induzidas por clonidina do arco aórtico foram medidas com uso de banho de tecido de unidade Radnoti 8 (Radnoti Glass Technology, Monrovia, CA) e o transdutor de força acoplado a um polígrafo Grass P7D. A resposta de dose foi registrada para 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, e 10  $\mu\text{M}$  de clonidina com ou sem tratamento de ET-I (4 nM) e o valor de  $\text{ED}_{50}$  foi calculado. Os experimentos foram realizados no Grupo 1: Veículo + Clonidina (0,25 a 10  $\mu\text{M}$ ); e Grupo 2: ET-I (4 nM) + Clonidina (0,25 a 10  $\mu\text{M}$ ) com uso de (n=6) ratos em cada grupo.

### Determinação de expressão de $\text{ET}_A\text{r}$ no cérebro e aorta abdominal

O cérebro e aorta abdominal isolados de ratos tratados com veículo e clonidina foram homogeneizados em tampão RIPA (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 120 mM de NaCl, 1,0% de Triton X100, 0,1% de SDS, 1% de deoxicolato de sódio, 10% de glicerol, 1 mM de EDTA e inibidor de protease IX, Roche). As proteínas foram isoladas em forma solubilizada e as concentrações foram medidas por reagente fenol de Folin-Ciocalteu. A proteína solubilizada (10 µg) foi desnaturada em tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad), redissolvida em 10% de SDS-PAGE e transferida em membrana de nitrocelulose seguido por bloqueio de membrana com 5% de BSA (w/v) em TBST (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20). As membranas foram incubadas com anticorpos anti-ETA policlonais de coelho (1:1000), seguido por anticorpos secundários conjugados por HRP (1:1000) e visualizadas por sistema de detecção de transferência por western blot ECL Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire UK). As membranas retiradas foram retestadas com anticorpo primário β-actina (1:1000) por um controle de carga de proteína.

## 20 **Projeto de estudo**

Foi permitido que os animais se estabilizassem por ao menos 20 min seguindo-se procedimentos cirúrgicos.

### **Estudos em clonidina:**

Os estudos seguintes foram realizados para determinar o envolvimento de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina (MAP, HR, e PP).

*Estudo 1: Determinar os efeitos cardiovasculares de clonidina (N=4).*



Grupo 1: Clonidina (10 µg/kg, Lv.); Grupo 2: Clonidina (30 µg/kg, i.v.); e Grupo 3: Clonidina (90 µg/kg, i.v.)

*Estudo 2: Determinar o efeito de ET-I em efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina (N=4).*

5 Grupo 1 : ET-I (100 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 2: ET-I (300 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 3: ET-I (900 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 4: Veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 5: ET-I (100 ng.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 6: ET-I (300 ng.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); e Grupo 7: ET-I (900 ng.kg<sup>-1</sup>) +  
10 clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>).

*Estudo 3: Determinar o efeito de TAK-044 (bloqueador de receptor ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> não seletivo) e BMS-182874 (receptor de ET<sub>B</sub> seletivo) em efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina (N=4).*

15 Grupo 1: TAK-044 (1 mg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 2: BMS-182874 (9 mg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 3: Veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 4: TAK-044 (1 mg.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); e Grupo 5: BMS-182874 (9 mg.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>).

*Estudo 4: Determinar o efeito de prazosina em*  
20 *alterações induzidas por ET-I em respostas cardiovasculares de clonidina (N=4)*

Grupo 1 : Veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>);  
Grupo 2: Prazosina (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>) + clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>); e  
Grupo 3: ET-I (300 ng.kg<sup>-1</sup>) + prazosina (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>) +  
25 clonidina (10 µg.kg<sup>-1</sup>).

*Estudo 5: Determinar o nível de ET-I de plasma em ratos tratados com clonidina (N=4)*

Grupo 1 : Veículo (1 ml/kg, i.v.); Grupo 2: Clonidina (10 µg/kg, Lv.); e Grupo 3: Clonidina (90 µg/kg, i.v.)

**Estudos em centaquina:**

Os estudos seguintes foram realizados para determinar o envolvimento de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina (MAP, HR, e PP).

5        *Estudo 1: Determinar os efeitos cardiovasculares de clonidina (N=5).*

Grupo 1 : Centaquina (0,05 mg/kg, i.v.); Grupo 2: Centaquina (0,15 mg/kg, i.v.); e Grupo 3: Centaquina (0,45 mg/kg, i.v.)

10       *Estudo 2: Determinar o efeito de ET-I em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina (N=4).*

Grupo 1 : ET-I (100 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 2: ET-I (300 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 3: ET-I (900 ng.kg<sup>-1</sup>); Grupo 4: Veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 5: ET-I (100 ng.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 6: ET-I (300 ng.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>); e Grupo 7: ET-I (900 ng.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>).

20       *Estudo 3: Determinar o efeito de TAK-044 (bloqueador de receptor de ETA/ETB não seletivo) e BMS-182874 (receptor de ETB seletivo) em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina (N=4).*

Grupo 1 : TAK-044 (1 mg.kg<sup>-1</sup>) + veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>); Grupo 2: BMS-182874 (9 mg.kg<sup>-1</sup>) + veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>); Grupo 3: Veículo (1 ml.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>); Grupo 4: TAK-044 (1 mg.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>); e Grupo 5: BMS-182874 (9 mg.kg<sup>-1</sup>) + centaquina (0,15 mg.kg<sup>-1</sup>).

*Estudo 4: Determinar o efeito de prazosina em alterações induzidas por ET-I em respostas cardiovasculares de centaquina (N=4)*

Grupo 1 : Veículo ( $1 \text{ ml.kg}^4$ ) + centaquina ( $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ); Grupo 2: Prazosina ( $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) + centaquina ( $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ); e Grupo 3: ET-I ( $300 \text{ ng.kg}^4$ ) + prazosina ( $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) + centaquina ( $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

5        *Estudo 5: Determinar o nível de ET-I de plasma em ratos tratados com centaquina (N=4)*

Grupo 1: Veículo ( $1 \text{ ml/kg}$ , Lv.); Grupo 2: centaquina ( $0,15 \text{ mg/kg}$ , i.v.); e Grupo 3: centaquina ( $0,45 \text{ mg/kg}$ , i.v.)

10        Nos estudos acima, todos os fármacos foram injetados através da veia femoral esquerda e as alterações em MAP, HR, e PP após a injeção de clonidina e centaquina foram registradas por 1 hora com uso do sistema de aquisição de dados Millar PowerLab 16/30.

15        **Análise estatística de dados**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. A significância de diferenças foi estimada por análise unidirecional de variância (comparação intra grupo com relação aos dados de linha de base) e análise bidirecional de variância (comparação inter grupo com relação aos pontos de tempo correspondentes de cada grupo) seguida por aplicação das Comparações Múltiplas de Dunnett e teste Bonferroni respectivamente. Um valor P de menos que 0,05 foi considerado como sendo significativo. A análise estatística foi processada com o software GraphPad Prism Versão 5.00.

25

### **Resultados**

**Efeito de clonidina e centaquina em gases de sangue arterial**

O pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , lactato e hematócrito de sangue arterial foram monitorados antes e uma hora após a administração de clonidina (90  $\mu g/kg$ ) e centaquina (0,45 mg/kg), e foi descoberto que não houve alterações significantes nesses parâmetros com ambas a clonidina ou a centaquina (Tabela 1). As amostras de sangue foram extraídas da cânula arterial com uso de seringas de amostragem de gás sanguíneo (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) e analisadas com uso de uma unidade GEM Premier 3000 (Instrument Laboratory, Lexington, MA).

A Tabela 1 sumariza os níveis de pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , lactato, e hematócrito de sangue arterial antes e após a administração de clonidina (90  $\mu g/kg$ ) e centaquina (0,45 mg/kg). Foi descoberto que não houve alterações significantes nesses parâmetros com ambas a clonidina ou a centaquina.

Tratamento	pH	$pCO_2$ (133,3 Pa)	$pO_2$ (133,3 Pa)	$Na^+$ (mmol/l)	$K^+$ (mmol/l)	Lactato (mg/dl)	Hct (%)
Linha de base	7,28 $\pm$ 0,02	47 $\pm$ 3	114 $\pm$ 3	140 $\pm$ 2	3,6 $\pm$ 0,2	2,42 $\pm$ 0,32	46 $\pm$ 2
Clonidina	7,28 $\pm$ 0,03	46 $\pm$ 4	100 $\pm$ 14	139 $\pm$ 2	4,3 $\pm$ 0,6	1,35 $\pm$ 0,25	50 $\pm$ 4
Linha de base	7,30 $\pm$ 0,03	47 $\pm$ 4	104 $\pm$ 1	144 $\pm$ 3	3,5 $\pm$ 0,3	2,42 $\pm$ 0,17	46 $\pm$ 2
Centaquina	7,27 $\pm$ 0,02	53 $\pm$ 2	96 $\pm$ 9	140 $\pm$ 1	4,0 $\pm$ 0,2	1,25 $\pm$ 0,55	52 $\pm$ 1

#### Envolvimento de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina

20 Efeitos cardiovasculares dependentes de dose de clonidina

A clonidina administrada de forma intravenosa produzir uma diminuição significativa em MAP. Doses baixas de clonidina (10 µg/kg) produziram uma queda em a MAP de 24,02% ( $p < 0,01$ ; comparada à linha de base), enquanto uma  
5 dose de 30 µg/kg dose produzir uma queda em MAP de 26,15% ( $p < 0,01$ ; comparada à linha de base). A queda em MAP foi de 19,48% ( $p < 0,01$ ; comparada à linha de base) com 90 µg/kg dose de clonidina. A queda em MAP induzida por clonidina com dose de 10 e 30 µg/kg foi significativamente ( $p < 0,01$ )  
10 maior que aquela induzida por dose de 90 µg/kg dose de clonidina (Figura IA).

A administração de clonidina produzir uma redução significativa em PP. A diminuição em PP foi de 33,81% com dose de 10 µg/kg, 36,39% com dose de 30 µg/kg, e 34,27% com  
15 dose de 90 µg/kg de clonidina. A diminuição em PP foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) comparada à respectiva linha de base. A diminuição em PP foi similar com todas as doses de clonidina (Figura IB).

A clonidina produzir uma diminuição em HR. Uma dose de  
20 10 µg/kg produziu uma diminuição em HR de 20,84%, enquanto 30 µg/kg produziram 23,18% de diminuição, e 90 µg/kg produziram 23,19% de diminuição. A bradicardia induzida por clonidina foi similar com todas as doses (Figura 1C).

*Efeito de ET-I em efeitos cardiovasculares induzidos*  
25 *por clonidina*

Nesses experimentos, uma dose baixa de clonidina (10 µg/kg) foi usada e foi descoberto que em ratos tratados com ET-I (100, 300, ou 900 ng/kg), a queda em MAP normalmente induzida por clonidina não foi observada. O tratamento com

ET-I (100 ng/kg) atenuou significativamente a queda induzida por clonidina em MAP. A atenuação máxima foi de 27,63% ( $p < 0,01$ ) comparada aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. Similarmente, uma dose de 300 ng/kg de ET-I produziu uma atenuação de diminuição induzida por clonidina em MAP de 27,41% quando comparada aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. O tratamento com ET-I na dose de 900 ng/kg produziu atenuação significativa (42,58%;  $p < 0,001$ ) de diminuição induzida por clonidina em MAP, comparada aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. A análise estatística mostrou que a atenuação de diminuição induzida por clonidina em MAP foi similar em ratos tratados com doses diferentes (100, 300, e 900 ng/kg) de ET-I (Figura 2A).

A diminuição induzida por clonidina em PP foi atenuada por tratamento com ET-I. A dose de 100 ng/kg de ET-I foi a mais efetiva na atenuação (33,66%) de queda induzida por clonidina em PP e foi descoberto que é estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). No entanto, as doses de 300 e 900 ng/kg mostraram atenuação, mas não alcançaram o nível de significância estatística (Figura 2B).

Os ratos tratados com ET-I (100, 300, ou 900 ng/kg) quando injetados com clonidina não mostraram redução significativa em HR comparada à linha de base. O tratamento com ET-I na dose de 100 ng/kg mostrou 18,01% de atenuação de diminuição induzida por clonidina em HR, quanto uma dose de 300 ng/kg de ET-I mostrou 21,00% de atenuação e uma dose de 900 ng/kg de ET-I produziu 37,42% ( $p < 0,001$ ) de atenuação

de HR comparada aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina (Figura 2C).

*Efeito de antagonistas de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina*

5 Os ratos tratados com um antagonista de receptor de  $ET_A/ET_B$ , TAK-044 (1 mg/kg), ou um antagonista de receptor de  $ET_A$ , BMS-182874 (9 mg/kg), quando injetados com clonidina (10 µg/kg) mostraram significativa redução em MAP de 36,59% e 29,44%, respectivamente quando comparados com a  
10 linha de base. Nos ratos tratados com TAK-044, a clonidina produziu uma diminuição máxima de 17,68% ( $p < 0,05$ ) em MAP comparados aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. No entanto, em ratos tratados com BMS-182874, a clonidina produzir uma diminuição máxima de 4,81% em MAP  
15 comparados aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina (Figura 3A).

Os ratos tratados com TAK-044 ou BMS-182874, quando injetados com clonidina, mostraram redução significativa em PP e uma diminuição máxima de 52,72% e 44,97%,  
20 respectivamente, comparada à linha de base. Nos ratos tratados com TAK-044, a clonidina produziu uma diminuição máxima de 31,42%, enquanto aqueles tratados com BMS-182874 produziram uma diminuição de 17,06% em PP comparados aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. A  
25 diminuição em PP em ratos tratados com TAK-044 foi significativamente maior comparada àqueles tratados com BMS-182874 (Figura 3B).

A clonidina produziu uma diminuição em HR que foi similar em ratos tratados com TAK-044 ou BMS-182874. Em

ratos tratados com TAK-044, a clonidina produziu uma diminuição máxima de 8,83% in HR quando comparados aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina. Em ratos tratados com BMS-182874, a clonidina produziu uma  
5 diminuição máxima de 5,85% em HR quando comparados aos ratos tratados com veículo que receberam clonidina (Figura 3C). Os ratos tratados com TAK-044 (1 mg/kg) ou BMS-182874 (9 mg/kg) somente não mostraram alteração significativa em MAP, PP, e HR (Figuras 3A, 3B, e 3C).

10 *Efeito de prazosina em alterações induzidas por ET-I em respostas cardiovasculares de clonidina*

Em ratos tratados com ET-I (300 ng/kg) e prazosina (0,1 mg/kg), a clonidina não produziu alteração em MAP comparada à linha de base. A prazosina bloqueou  
15 completamente as alterações produzidas em MAP por clonidina em ratos tratados com ET-I (Figura 4A).

Similarmente, em ratos tratados com ET-I e prazosina, a clonidina não produziu alteração em PP comparada à linha de base. A prazosina atenuou significativamente a diminuição  
20 em PP induzida por clonidina em ratos tratados com ET-1 (Figura 4B).

Em ratos tratados com ET-I e prazosina, a clonidina não produziu alteração significativa em HR comparada à linha de base. A prazosina atenuou significativamente ( $p < 0,05$ ) a  
25 diminuição em HR induzida por clonidina em ratos tratados com ET-I (Figura 4C).

*Nível de plasma de ET-I em ratos tratados com clonidina*



Os níveis de plasma de ET-I na linha de base foram descobertos sendo de  $12,18 \pm 0,42$  pg/ml e após 1 hora de tratamento com veículo, os níveis de ET-I de plasma forma descobertos sendo de  $11,97 \pm 1,29$  pg/ml. Em ratos tratados com 10 µg/kg de clonidina, os níveis de ET-I da linha de base foram de  $12,39 \pm 0,62$  pg/ml e 1 hora de tratamento não produziu qualquer alteração no nível de ET-I de plasma ( $13,45 \pm 0,68$  pg/ml). Similarmente, em ratos tratados com uma alta dose de clonidina (90 µg/kg), os níveis de ET-I de linha de base foram de  $12,59 \pm 0,77$  pg/ml e o tratamento com clonidina não produziu qualquer efeito significativo nos níveis de ET-I de plasma ( $11,31 \pm 0,92$  pg/ml).

*Efeito de clonidina no arco aórtico abdominal*

A clonidina produziu uma contração dependente de dose (0,25 a 10 µM) no arco aórtico abdominal dos ratos, enquanto na aorta pré-tratada com ET-I a resposta contrátil de clonidina foi significativamente potencializada ( $p < 0,001$ ). A contração por cento da aorta produzida por clonidina (2 µM), na aorta tratada com veículo e ET-I (4 nM), foi de  $51,017 \pm 1,70\%$  e  $75,95 \pm 1,36\%$ , respectivamente, enquanto com uma dose de 4 µM de clonidina, a contração por cento na aorta tratada com veículo e ET-I foi de  $80,27 \pm 2,48\%$  e  $96,83 \pm 0,54\%$ , respectivamente. O valor de  $ED_{50}$  de clonidina foi de  $2,64 \pm 0,02$  µM na aorta tratada com veículo, enquanto na aorta tratada com ET-I, o valor de  $ED_{50}$  de clonidina foi de  $1,81 \pm 0,04$  µM, o que indica uma potenciação significativa ( $p < 0,001$ ) de resposta de clonidina por ET-I.

## Envolvimento de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina

### *Efeitos cardiovasculares dependentes por dose de centaquina*

5 A centaquina administrada de forma intravenosa em ratos produziu diminuição dependente de dose significativa em MAP. As doses de  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ , e  $0,45 \text{ mg.kg}^{-1}$  de centaquina produziram diminuição significativa de 15,64, 25,15, e 28,08% ( $p < 0,001$ ), respectivamente, 10 comparadas à linha de base. A diminuição em MAP produzida por doses de  $0,15$  ou  $0,45 \text{ mg.kg}^{-1}$  foi mais significativa comparada à dose de  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Figura 5A).

Os ratos administrados com doses de  $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $0,15 \text{ mg/kg}$ , e  $0,45 \text{ mg.kg}^{-1}$  de centaquina mostraram 10,49, 12,57, 15 e 13,34% ( $p < 0,01$ ) de redução em HR, respectivamente, comparados à linha de base (Figura 5B).

### *Efeito de ET-I em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina*

Os ratos tratados com doses de 100, 300, e  $900 \text{ ng.kg}^{-1}$  de ET-I mostraram uma queda ( $p < 0,001$ ) seguido por elevação 20 significativa ( $p < 0,001$ ) em MAP (Figura 6A), apesar de nenhuma alteração em HR (Figura 6B) ter sido observada comparado à linha de base. Uma dose média de  $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$  de centaquina foi usada por estudos subsequentes. As doses 25 menores de ET-I ( $100$  e  $300 \text{ ng.kg}^{-1}$ ) mostraram uma atenuação estatisticamente insignificante pequena de diminuição induzida por centaquina em MAP, enquanto uma dose mais alta de  $900 \text{ ng.kg}^{-1}$  mostrou atenuação significativa (33,48%;  $p < 0,001$ ) de diminuição induzida por centaquina em MAP

comparada aos ratos tratados com veículo que receberam centaquina (Figura 7A).

A administração de centaquina ( $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) produziu uma diminuição em HR. A diminuição em HR produzida por foi  
 5 similar em ratos tratados com veículo ou dose de  $100 \text{ ng.kg}^{-1}$  de ET-I. no entanto, em ratos tratados com dose mais alta ( $300 \text{ ng.kg}^{-1}$ ) de ET-I, a diminuição induzida por centaquina em HR foi significativamente atenuada. A dose de  $900 \text{ ng/kg}$  de ET-I produziu uma atenuação notória de 21,44% ( $p < 0,001$ )  
 10 em diminuição induzida por centaquina em HR comparada aos ratos tratados com veículo que receberam centaquina (Figura 7B).

*Efeito de antagonistas de ET em efeitos cardiovasculares induzidos por centaquina*

15 A centaquina ( $0,15 \text{ mg/kg}$ ) produziu uma diminuição em MAP. No entanto, em ratos tratados com o antagonista de receptor de  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$  TAK-044 ( $1 \text{ mg/kg}$ ), a centaquina produziu uma diminuição notória de 32,31% ( $p < 0,01$ ) em MAP comparada à linha de base. Em ratos tratados com o  
 20 antagonista de receptor de  $\text{ET}_A$  BMS-182874 ( $9 \text{ mg/kg}$ ), a centaquina produziu diminuição ainda mais significante de 43,46% ( $p < 0,001$ ) em MAP comparada à linha de base. Foi descoberto que o tratamento com TAK-044 produziu potenciação de efeito de centaquina em 16,48% ( $p > 0,05$ ),  
 25 enquanto o tratamento com BMS-182874 produziu uma potenciação de 30,67% ( $p < 0,001$ ) comparado aos ratos tratados com veículo (Figura 7A).

A centaquina produziu uma diminuição em PP. Em ratos tratados com TAK-044, a centaquina produziu uma diminuição

em PP de 46,49% ( $p < 0,001$ ) comparada à linha de base. Em ratos tratados com BMS-182874, a centaquina produziu uma diminuição em PP de 49,68% ( $p < 0,001$ ) comparada à linha de base. A diminuição em PP induzida por centaquina foi similar em ratos tratados com TAK-044 e BMS-182874 (Figura 7B).

Uma diminuição em HR foi produzida por administração de centaquina. Em ratos tratados com TAK-044, a centaquina produziu uma diminuição em HR de 21,94%, comparada à linha de base. No entanto, em ratos tratados com BMS-182874, a centaquina produziu uma diminuição em HR de 35,72% ( $p < 0,001$ ), comparada à linha de base. Foi descoberto que TAK-044 produziu potenciação de diminuição induzida por centaquina em HR de 12,74%, enquanto BMS-182874 produziu potenciação de 29,00% ( $p < 0,001$ ) em HR comparada aos ratos tratados com veículo. A potenciação de diminuição induzida por centaquina em HR por BMS-182874 foi significativamente maior que a produzida por tratamento com TAK-044 de 18,63% ( $p < 0,05$ ) (Figura 7C). Os ratos tratados com TAK-044 (1 mg/kg) ou BMS-182874 (9 mg/kg) somente não mostraram alteração significante em MAP e HR (Figuras 7A e 7B).

*Efeito de prazosina em alterações induzidas por ET-I em respostas cardiovasculares de centaquina*

Em ratos tratados com ET-I (300 ng/kg) e prazosina (0,1 mg/kg), a centaquina não produziu nenhuma alteração em MAP comparada à linha de base. A prazosina bloqueou completamente ( $p < 0,01$ ) as alterações produzidas em MAP por centaquina em ratos tratados com ET-I (Figura 8A).

Similarmente, em ratos tratados com ET-I e prazosina, a centaquina não produziu alteração em PP comparada à linha de base. A prazosina atenuou significativamente ( $p < 0,001$ ) a diminuição em PP induzida por centaquina em ratos tratados com ET-I (Figura 8B).

Em ratos tratados com ET-I e prazosina, a centaquina não produziu alteração significativa em HR comparada à linha de base. A prazosina atenuou significativamente ( $p < 0,05$ ) a diminuição em HR induzida por centaquina em ratos tratados com ET-I (Figura 8C).

A prazosina também bloqueou as alterações em MAP e HR fornecidas por centaquina em ratos tratados com veículo (Figuras 8A e 8B).

Nível de ET-I de plasma em ratos tratados com centaquina

Os níveis de ET-1 de plasma de linha de base foram  $12,18 \pm 0,42$  pg/ml, e após 1 hora de tratamento com veículo foram  $11,97 \pm 1,29$  pg/ml. Os níveis de ET-I de plasma não mostraram qualquer alteração em ratos tratados com veículo.

Em ratos tratados com centaquina (0,15 mg/kg), os níveis de ET-I de linha de base foram  $10,89 \pm 1,77$  pg/ml e 1 hora de tratamento não produziu qualquer alteração em nível de ET-I de plasma ( $10,39 \pm 1,75$  pg/ml). Similarmente, em ratos tratados com uma alta dose de centaquina (0,45 mg/kg), os níveis de ET-I de linha de base foram  $11,83 \pm 1,04$  pg/ml e o tratamento com centaquina não produziu qualquer efeito significativo em nível de ET-I de plasma ( $11,67 \pm 1,41$  pg/ml).

A presente revelação ilustra a interação de agonistas e antagonistas de ET com fármacos anti-hipertensivos de ação central, clonidina e centaquina.

A clonidina é um fármaco anti-hipertensivo, que age  
5 estimulando os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos no cérebro (Schmitt, 1969; UTrichard et al, 1977; Kobinger, 1978) levando à diminuição o rendimento cardíaco, resistência vascular periférica e pressão sanguínea. Esta tem especificidade direcionada aos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos  
10 pré-sinápticos no centro vasomotor na haste do cérebro (Schmitt, 1969; Kobinger, 1978). Esta diminui os níveis de cálcio pré-sináptico, e inibe a liberação de norepinefrina e o efeito líquido é a diminuição em tom simpático (Langer et al., 1980; van Zwieten et al., 1984; Chen et al., 1994).  
15 A clonidina também tem atividade agonista  $\alpha_1$ -adrenérgica periférica, que pode produzir vasoconstrição transiente e hipertensão quando administrada sistematicamente em doses mais altas. Tem uma afinidade mais alta de aglutinação de aproximadamente 10 vezes para os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos  
20 que para os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, ambos em ensaios de aglutinação e em órgãos isolados (UTrichard et al., 1977). O efeito hipotensivo da clonidina é mediado através da estimulação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Kobinger, 1978; Guyenet e Cabot, 1981), enquanto o efeito hipertensivo é  
25 devido à vasoconstrição causada por estimulação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos periféricos (Timmermans e Van Zwieten, 1980; Bousquet e Schwartz, 1983).

Embora estruturalmente diferente da clonidina, a centaquina produz uma queda em MAP e HR similar àquela

vista com a clonidina em gatos e ratos (Srimal et al., 1990). Acredita-se que a centaquina, como a clonidina, age principalmente nos  $\alpha_2$ -adrenoreceptores centrais. Mediante administração crônica em ratos, ambas a centaquina e a clonidina produziram hipotensão e bradicardia associada com uma regulação ascendente em receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no hipotálamo e medula (Gulati et al., 1991a; Gulati et al., 1991b).

A clonidina ou a centaquina administradas de forma intravenosa produziram uma hipotensão e bradicardia dependentes de dose. O tratamento com ET-I atenuou completamente a hipotensão e bradicardia induzidas por clonidina e centaquina. Em ratos tratados com uma alta dose de ET-I, hipertensão e taquicardia foram observadas quando clonidina ou centaquina foram administradas. Esta atenuação de efeito de clonidina ou centaquina por ET-I poderia ser devido à sensibilização acentuada de receptores adrenérgicos periféricos que resulta em bloqueio funcional de hipotensão induzida por clonidina (Gulati e Srimal, 1993) ou centaquina. Pode ser teorizado, mas não assegurado, que o tratamento com ET-I aumentou a sensibilidade de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos periféricos na extensão em que, quando clonidina ou centaquina foi administrada, um efeito hipertensivo notório foi produzido de forma que efeito hipotensivo central foi mascarado e não foi observado.

A fim de confirmar o envolvimento de ET endógeno na modulação de receptores adrenérgicos periféricos estudos foram executados com uso de antagonistas de ET. Dois

antagonistas de ET diferentes foram usados: TAK-044 (bloqueador de receptor de ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> não seletivo) (Dceda et al., 1994) e BMS-18287 (bloqueador de receptor de ET<sub>A</sub> seletivo) (Stein et al., 1994). Os ratos pré-tratados com

5 TAK-044 e BMS-182874 mostraram potenciação do efeito hipotensivo de clonidina ou centaquina, indicando o envolvimento de ET endógeno na hipertensão periférica causada por clonidina. A potenciação foi descoberta como

10 sendo mais proeminente com TAK-044 comparado a BMS-182874, indicando o possível envolvimento de receptores de ET<sub>B</sub> nos efeitos periféricos induzidos por clonidina (Tabela 2). O tratamento com prazosina também foi usado para determinar se receptores  $\alpha$ -adrenérgicos estão envolvidos na

15 potenciação de ET-I de efeitos cardiovasculares induzidos por clonidina ou centaquina. Os ratos tratados com ET-I e prazosina quando injetados com clonidina mostraram bloqueio completo de atenuação induzida por ET-I de resposta de

clonidina, confirmando que esse efeito é mediado através de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos periféricos.

20 A Tabela 2 sumariza o efeito de antagonista de receptor de ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> não seletivo TAK-044 e antagonista de receptor de ET<sub>A</sub> seletivo BMS-182874 em alterações induzidas por clonidina (10  $\mu$ g/kg) e centaquina (0,33 mg/kg) em pressão arterial, pressão de pulso e frequência cardíaca

25 médias. Uma alteração por cento é expressa comparada à resposta de clonidina ou centaquina em ratos de controle.

	Hipotensão		Diminuição em pressão de pulso		Bradycardia	
	Clonidina	Centaquina	Clonidina	Centaquina	Clonidina	Centaquina
TAK-044	++ (17,68%)	++ (16,48%)	++++ (31,42%)	+++ (23,83%)	+ (8,83%)	++ (12,74%)
BMS-182874	+ (4,81%)	++++ (30,67%)	++ (17,06%)	+++ (28,72%)	++ (5,85%)	++++ (29,00%)



O envolvimento de receptores adrenérgicos periféricos na modulação de efeito de clonidina por ET-I foi demonstrado anteriormente por estudos conduzidos em ratos de seção cervical em que clonidina dada de forma intravenosa não produziu qualquer efeito na pressão sanguínea e frequência cardíaca, o que indica que devido à clonidina de seção cervical não é possível produzir sua ação em CNS. No entanto, resposta hipertensiva significativa foi obtida quando clonidina foi administrada em seguida ao tratamento com ET-I em ratos em seção cervical (Gulati e Srimal, 1993). Esses resultados confirmaram o envolvimento do sistema vascular periférico no efeito hipertensivo de clonidina em ratos tratados com ET-I.

Os presentes resultados foram suportados por estudos que mostram que ET-I é um importante modulador de tom vasomotor e tem sido demonstrado que ET-I é capaz de amplificar a resposta contrátil de diversos compostos vasoativos (Consigny, 1990; Nakayama et al., 1991; Gondre e Christ, 1998). Interferência entre receptores de ET<sub>A</sub> e receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos foi registrada. Em fibroblastos de rato transfectados com receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos de hamster, a ativação de receptores de ET<sub>A</sub> resultou em fosforilação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos e inibição de ativações de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Vazquez-Prado et al., 1997; D'Angelo et al., 2006). O papel de modulador de endotélio em vasoconstrição induzida por agonista  $\alpha$ -adrenérgico foi mostrada, devido ao fato de que a remoção de endotélio acentuou a sensibilidade e resposta contrátil máxima a agonistas adrenérgicos mostrando envolvimento de

óxido nítrico (Carrier e White, 1985). Os resultados do presente estudo conduzido *in vivo* claramente demonstram que ET-I altera as respostas de fármacos adrenérgicos, por exemplo, clonidina e centaquina, potencializando a vasoconstrição periférica mediada por meio de receptores adrenérgicos. Embora a clonidina esteja agindo principalmente em receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e menos em receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, os estudos mostraram que a prazosina (um antagonista de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgicos) bloqueia as contrações induzidas por clonidina da artéria dorsal (Kennedy et al., 2006). Isso dá suporte à descoberta de que a modulação de respostas cardiovasculares induzidas por clonidina e centaquina por ET-I poderiam ser completamente bloqueadas pela prazosina. O envolvimento de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos é ainda suportado por estudos em que foi descoberto que esses receptores mediam as respostas contráteis à norepinefrina na artéria femoral (Jarajapu et al., 2001). As preparações de arco vascular da artéria da orelha do coelho e torácica aorta do rato mostraram que subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos estão envolvidos nas contrações (Fagura et al., 1997). Um estudo recente mostra que há um aumento no estímulo simpático e atividade parassimpática reduzida seguido ao tratamento de 7 dias com um antagonista de receptor de  $ET_A/ET_B$  não seletivo, bosentano, (Souza et al., 2008) indicando que o ET endógeno exerce um papel importante no controle autonômico.

É interessante notar que um antagonista de receptor de  $ET_A/ET_B$  não seletivo, TAK-044, foi significativamente mais efetivo em potencializar a hipotensão e bradicardia

induzidas por clonidina comparada à centaquina. Por outro lado, um antagonista de receptor de  $ET_A$  seletivo, BMS-182874, foi mais efetivo em potencializar a hipotensão e bradicardia induzidas por centaquina comparada à clonidina.

5 Além disso, TAK-044 produziu potenciação mais ou menos similar de respostas de MAP, PP, e HR de clonidina e centaquina, enquanto BMS-182874 produziu potenciação significativamente mais notória de efeito de centaquina em MAP, PP e HR comparado à clonidina (Tabela 2). Esses  
10 resultados indicam que adicionalmente aos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos outros receptores também podem exercer um papel, e que o mecanismo de ação da clonidina e centaquina são diferentes. Isso também suporta o envolvimento de receptores  $ET_A$  ao invés de receptores de  $ET_B$  na modulação  
15 de efeitos cardiovasculares de fármacos adrenérgicos por ET.

Outros receptores também podem estar envolvidos devido ao fato de que foi descoberto que a administração repetida de clonidina ou centaquina produziu regulação ascendente de  
20 receptores 5-HT<sub>1</sub> na medula (Gulati et al., 1991a; Gulati et al., 1991b) indicando que ambas a centaquina e a clonidina também podem estar agindo em receptores 5-HT<sub>1</sub>. Diversos registros mostraram que concentrações limite ou próximas ao limite de ET-I potenciam a resposta contrátil a outros  
25 agentes vasoativos como 5-HT (Consigny, 1990; Nakayama et al., 1991). No tratamento com clonidina ou centaquina não produz qualquer alteração em níveis de ET-I de plasma, é mais provável que haja uma interação de receptores de ET com receptores adrenérgicos.

Quando a clonidina é administrada a um paciente com função autonômica intacta, resulta em uma elevação transiente na pressão sanguínea, seguida por uma queda prologada na pressão sanguínea e, a fim de que a clonidina seja efetiva em abaixar a pressão sanguínea, a integridade autonômica é uma necessidade (Naftchi e Richardson, 1997). Em pacientes com danos na medula espinhal, os efeitos que agem periféricamente da clonidina e centaquina podem dominar levando a vasoconstrição e hipertensão (Backo et al., 2002). Em tais casos, o uso de um antagonista de ET juntamente com um agente adrenérgico, por exemplo, clonidina ou centaquina, pode ser uma opção terapêutica útil para prevenir efeitos adversos.

Casos de intoxicação por clonidina foram registrados (Pai e Lipsitz, 1976), e os sintomas de intoxicação de forma geral resultam de ação central de clonidina, embora hipertensão que complica a dosagem excessiva tenha sido também registrada (Kobinger e Walland, 1967; Hunyor et al., 1975). Um caso de emergência hipertensiva foi relatado em um paciente mantido com clonidina e mirtazepina prescritas concorrentemente (Abo-Zena et al., 2000). Um possível mecanismo especulativo dessa interação e urgência hipertensiva é que a clonidina exerce seu efeito anti-hipertensivo através de atividade agonista em receptores inibitórios  $\alpha_2$ -adrenérgicos centrais e a mirtazepina antidepressante age como um antagonista nos mesmos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Troncoso e Gill, 2004). Em uma dose alta, isso desloca a clonidina, levando a uma possível perda de efeito anti-hipertensivo. A hipertensão de

religação adicional de retirada de clonidina parece exacerbar o estado hipertensivo anterior. Pode ser especulado que em tais casos os antagonistas de ET podem ser de uso para reduzir os efeitos adversos da clonidina.

5        Foi descoberto que ET pode modular os efeitos cardiovasculares mediados através de receptores adrenérgicos vasculares. Esse é o primeiro relato que mostra que antagonistas de ET podem potencializar os efeitos anti-hipertensivos da clonidina e centaquina. Um  
10       antagonista de ET pode, então, ser útil no tratamento de efeitos tóxicos devido a uma overdose de clonidina. Como os dois antagonistas de ET já no mercado americano para o tratamento de hipertensão pulmonar, e diversos estão em distribuição, pode ser importante explorar a interação  
15       desses agentes com outros fármacos anti-hipertensivos que agem no sistema adrenérgico. Devido ao fato do uso de clonidina ser limitado devido a seus efeitos adversos, uma combinação de antagonista de ET com clonidina ou centaquina pode ser uma opção útil para tratar hipertensão.

20       A Tabela 3 sumariza o mecanismo proposto pelo qual os antagonistas de receptor de ET-I e ET modulam alterações induzidas por clonidina e centaquina em pressão arterial média. A clonidina e centaquina agem nos receptores adrenérgicos centrais assim como periféricos. A estimulação  
25       de (a) receptores periféricos produz vasoconstrição, e (b) receptores centrais diminui o estímulo que produz vasodilatação, o resultado líquido é a queda na pressão sanguínea devido ao fato de que o efeito central domina sobre o efeito periférico. O tratamento com ET-I

notoriamente aumenta o efeito vasoconstrictor periférico e agora o efeito periférico domina sobre o central e o resultado líquido é um aumento na pressão sanguínea. No entanto, o tratamento com antagonista de ET diminui o efeito vasoconstrictor periférico, sendo assim, o efeito central sobre domina e o resultado líquido é um efeito hipotensivo notório.

Tratamento	Pressão arterial média		
	Vasodilataçã o Central	Vasoconstriçã o Periférica	Alteração na pressão sanguínea
Nenhum	+++	+	↓↓
ET-1	+++	++++	↑
Antagonista de ET	+++	-	↓↓↓↓

A Figura 1 mostra os efeitos cardiovasculares da clonidina (10, 30, e 90 µg/kg) em ratos anestesiados com uretano. O efeito de resposta por dose de clonidina foi registrado por 60 minutos e os valores para MAP (Figura IA), PP (Figura IB), e HR (Figura 1C) são expressos como média ± SEM com n=4 em cada grupo. \*p<0,05 comparado à linha de base e #p<0,05 comparado à dose de 10 µg/kg de clonidina.

A Figura 2 mostra o efeito de tratamento com ET-I (100, 300 e 900 ng/kg) em respostas cardiovasculares induzidas por clonidina em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 2A), PP (Figura 2B), e HR (Figura 2C) foram registrados por 60 minutos após a administração de clonidina (10 µg/kg), e os valores são expressos como média ± SEM com n=4 em cada grupo. p<0,05 comparado à linha de base e #p<0,05 comparado à dose de 10 µg/kg de clonidina.

A Figura 3 mostra o efeito do tratamento com antagonista de receptor de ETA/ETB não seletivo TAK-044 (1 mg/kg) e com antagonista de receptor de ET<sub>A</sub> seletivo BMS-182874 (9 mg/kg) em respostas cardiovasculares induzidas por clonidina em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 3A), PP (Figura 3B), e HR (Figura 3C) foram registrados por 60 minutos após a administração de clonidina (10 µg/kg), e os valores são expressos como média ± SEM com n=4 em cada grupo. \*p<0,05 comparado à linha de base e #p<0,05 comparado à dose de 10 µg/kg de clonidina.

A Figura 4 mostra o efeito de prazosina (0,1 mg/kg) em alterações induzidas por ET-I (300 ng/kg) em respostas cardiovasculares de clonidina (10 µg/kg) em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 4A), PP (Figura 4B), e HR (Figura 4C) foram registrados por 60 minutos após a administração de clonidina (10 µg/kg), e os valores são expressos como média ± SEM com n=4 em cada grupo. \*p<0,05 comparado à linha de base e #p<0,05 comparado à dose de 10 µg/kg de clonidina.

A Figura 5 mostra os efeitos cardiovasculares de centaquina (0,05, 0,15, e 0,45 mg/kg) em ratos anestesiados com uretano. O efeito de resposta por dose de centaquina foi registrado por 60 minutos, e os valores para MAP (Figura 5A), PP (Figura 5B) e HR (Figura 5C) são expressos como média ± SEM com n=4 em cada grupo. p<0,05 comparado à linha de base e #p<0,05 comparado à dose de 0,33 mg/kg de centaquina.

A Figura 6 mostra o efeito do tratamento com ET-I (100, 300, e 900 ng/kg) em respostas cardiovasculares

induzidas por centaquina em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 6A), PP (Figura 6B), e HR (Figura 6C) foram registrados por 60 minutos após a administração de centaquina (0,15 mg/kg), e os valores são expressos como  
 5 média  $\pm$  SEM com n=4 em cada grupo.  $p < 0,05$  comparado à linha de base e  $\#p < 0,05$  comparado à dose de 0,15 mg/kg de centaquina.

A Figura 7 mostra o efeito de tratamento com antagonista de receptor de ETA/ETB não seletivo TAK-044 (1  
 10 mg/kg) e antagonista de receptor de ET<sub>A</sub> seletivo BMS-182874 (9 mg/kg) em respostas cardiovasculares induzidas por centaquina em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 7A), PP (Figura 7B), e HR (Figura 7C) foram registrados por 60 minutos após a administração de centaquina (0,15 mg/kg),  
 15 e os valores são expressos como média  $\pm$  SEM com n=4 em cada grupo.  $*p < 0,05$  comparado à linha de base e  $\#p < 0,05$  comparado à dose de 0,33 mg/kg de clonidina.

A Figura 8 mostra o efeito de prazosina (0,1 mg/kg) em alterações induzidas por ET-I (300 ng/kg) em respostas  
 20 cardiovasculares de centaquina (0,15 mg/kg) em ratos anestesiados com uretano. O MAP (Figura 8A), PP (Figura 8B), e HR (Figura 8C) foram registrados por 60 minutos após a administração de centaquina (0,33 mg/kg), e os valores são expressos como média  $\pm$  SEM com n=4 em cada grupo.  
 25  $p < 0,05$  comparado à linha de base e  $\#p < 0,05$  comparado à dose de 0,15 mg/kg de centaquina.

#### Referências

- RA Abo-Zena et al., *Pharmacotherapy* 20:476 a 478 (2000).  
 AL Backo et al., *Ann Pharmacother* 36:1396 a 1398 (2002).



- UC Bajpai et al., *J. Molecular Structure* 516:15 a 21 (2000).
- M Bhatnagar et al., *Arzneimittelforschung* 35:693 a 697 (1985).
- 5 P Bousquet et al., *Biochem Pharmacol* 32:1459 a 1465 (1983).  
 R Brondani et al., *Clin Biochem* 40:282 a 284 (2007).  
 A Carpy et al., *Acta Ctystallographica* C47:227 a 229 (1991).  
 GO Carrier et al., *J Pharmacol Exp Ther* 232:682 a 687 (1985).
- 10 R Charu et al. *Thorax* 61:1011 a 1012 2006).  
 HI Chen *Circulation* 90:970 a 975 (1994).  
 PM Consigny *Eur J Pharmacol* 186:239 a 245 (1990).  
 G D'Angelo *Am J Physiol Heart Ore Physiol* 290:H1251 a 1258 (2006).
- 15 MS Fagura et al., *Br J Pharmacol* 120:247 a 258 (1997).  
 M Gondre et al., *J Pharmacol Exp Ther* 286:635 a 642 (1998).  
 A Gulati *Life Sci* 50:153 a 160 (1992).  
 A Gulati et al. *Drug Development Research* 23:307 a 323 (1991a).
- 20 A Gulati *Drug Development Research* 22:141 a 152 (1991b).  
 A Gulati et al. *Neuropeptides* 31:301 a 309 (1997a).  
 A Gulati et al. *Am J Physiol* 273:H1177 a 1186 (1997b).  
 A Gulati et al. (1993) *Eur J Pharmacol* 230:293 a 300.  
 PG Guyenet et al. *JNeurosci* 1:908 a 917 (1981).
- 25 KA Hickey et al. *Am J Physiol* 248:C550 a 556 (1985).  
 SN Hunyor et al. *Br Med J* 4:23 (1975).  
 S Dceda et al. *J Pharmacol Exp Ther* 270:728 a 733 (1994).  
 YP Jarajapu et al. *Eur J Pharmacol* 422:121 a 135 (2001).  
 WB Kennedy et al. *Cell MoI Neurobiol* 26:645 a 657 (2006).

- W Kobinger *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 81:39 a 100 (1978).
- W Kobinger et al. *Arzneimittelforschung* 17:292 a 300 (1967).
- 5 T Kuwaki et al. *Jpn J Physiol* 40:97 a 116 (1990).
- SZ Langer et al. *Hypertension* 2:372 a 382 (1980).
- OH Lowry et al. *J Biol Chem* 193:265 a 275 (1951).
- VA Murthi et al. em (patente EUA ed), *Council of Scientific and Industrial Research* (1976).
- 10 NE Naftchi et al. *J Spinal Cord Med* 20:355 a 360 (1997).
- K Nakayama et al. *Br J Pharmacol* 104:978 a 986 (1991).
- PT Nowicki et al. *J Pediatr* 146:805 a 810 (2005).
- Y Ouchi et al. *Am J Physiol* 256:H1747 a 1751 (1989).
- P Pacher et al. *NatProtoc* 3:1422 a 1434 (2008).
- 15 GS Pai et al. *Pediatrics* 58:749 a 750 (1976).
- T Radovits et al. *Vascul Pharmacol* 51:37 a 43 (2009).
- A Sakamoto et al. *J Biol Chem* 268:8547 a 8553 (1993).
- H Schmitt *Eur J Pharmacol* 6:8 a 12 (1969).
- SS Shetty et al. *Biochem Biophys Res Commun* 191:459 a 464 (1993).
- 20 HC Souza et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:751 a 756 (2008).
- RC Srimal et al. *Pharmacol Res* 22:319 a 329 (1990).
- PD Stein et al. *J Med Chem* 37:329 a 331 (1994).
- 25 Y Tabuchi et al. *Biochem Biophys Res Commun* 161:803 a 808 (1989).
- PB Timmermans et al. *Eur J Pharmacol* 63:199 a 202 (1980).
- AL Troncoso et al. *Psychosomatics* 45:449 a 450 (2004).
- DC U'Prichard et al. *MoI Pharmacol* 13:454 a 473 (1977).

PA van Zwieten et al. *Hypertension* 6:1128 a 1133 (1984).

J Vazquez-Prado et al., *J Biol Chem* 272:27330 a 27337 (1997).

SW Watts *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2009).

5 SW Watts *Hypertension* 35:244 a 248 (2000).

NP Wiklund et al., *Acta Physiol Scand* 134:311 a 312 (1988).

M Yanagisawa et al., *Nature* 332:411 a 415 (1988).

### **Métodos para Tratar Dor**

10 A presente invenção também se refere ao uso de centaquina como um analgésico para tratar dor em um sujeito.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar ou prevenir dor que compreende administrar a um mamífero em necessidade da mesma uma quantidade 15 terapeuticamente efetiva de centaquina. Em uma modalidade, a centaquina é coadministrada com um analgésico opiato.

Em uma modalidade, a centaquina é administrada em uma faixa de dose de cerca de 10 µg a cerca de 300 µg.

O presente método contempla que o sujeito a ser 20 tratado é um mamífero. Em uma modalidade, o sujeito mamífero é humano, ou qualquer modelo animal não humano para pesquisa média humana, ou um animal de importância como gado ou petes, por exemplo, animais de companhia. Em uma modalidade relacionada, o sujeito é um humano.

25 Em uma modalidade, a dor a ser tratada é dor crônica ou dor aguda. Em uma modalidade relacionada, a dor é selecionada do grupo que consiste de causalgia, alodinia tátil, dor neuropática, hiperalgesia, hiperpatia, dor inflamatória, dor pós-operatória, dor lombar crônica,

cefaleias em salvas, neuralgia pós-herpética, dor de membro artificial ou fantasma, dor central, dor de dente, dor neuropática, dor resistente a opioide, dor visceral, dor cirúrgica, dor de dano ósseo, dor neuropática diabética, 5 dor neuropática pós-cirurgia ou traumática, dor neuropática periférica, dor neuropática de aprisionamento, neuropatia causada por abuso de álcool, dor de infecção por HIV, hipotireoidismo de esclerose múltipla ou dor por quimioterapia anticâncer, dor durante trabalho e entrega, 10 dor resultante de queimaduras, incluindo queimadura de sol, dor pós-parto, enxaqueca, dor angina, e dor relacionada ao trato geniturinário incluindo cistite.

Em um aspecto adicional, a centaquina é útil para potencializar os efeitos analgésicos de um analgésico de 15 opiato. Como tal, a invenção fornece um método para tratar ou prevenir dor que compreende administrar a um mamífero em necessidade da mesma uma quantidade terapeuticamente efetiva de um analgésico de opiato e uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma centaquina.

20 O analgésico de opiato é selecionado do grupo que consiste de morfina, sulfato de morfina, codeína, diacetilmorfina, dextrometorfano, hidrocodona, hidromorfona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, oxycodona, levalorfanol, e sais dos mesmos.

25 Em uma modalidade, o analgésico de opiato e a centaquina são administrados simultaneamente. Em uma modalidade relacionada, o analgésico de opiato e a centaquina são administrados a partir de uma única composição ou de composições separadas. Em uma modalidade

adicional, o analgésico de opiato e a centaquina são administrados sequencialmente.

Em uma modalidade, a presente invenção se refere a métodos para tratar dor com uso de centaquina que produz  
5 analgesia e significativo alívio de estímulo de dor.

O termo "tratamento" conforme usado na presente invenção, se refere a prevenir ou de outra forma melhorar ou eliminar a dor. Como tal, o termo "tratamento" inclui ambas as administrações terapêutica e/ou profilática  
10 médica, conforme apropriado. O tratamento e alívio de sintomas de dor podem ser medidos com uso de escalas de avaliação de dor conhecidas na técnica. Protocolos exemplificativos incluem medição do limite de dor subjetivo (escala análoga visual) e o limite de reflexo de flexão  
15 nociceptiva objetiva (R III).

O termo "dor" conforme usado no presente documento, se refere a todos os tipos de dor. Em um aspecto, o termo se refere a dores agudas e crônicas. Os tipos exemplificadores de dor incluem, mas não se limitam a, causalgia, alodinia  
20 tátil, dor neuropática, hiperalgesia, hiperpatia, dor inflamatória, dor pós-operatória, dor lombar crônica, cefaleias em salvas, neuralgia pós-herpética, dor no membro e coto de amputação fantasma, dor central, dor dental, dor neuropática, dor resistente a opioide, dor visceral, dor  
25 cirúrgica, dor de lesão óssea, dor de neuropatia diabética, dor pós-cirurgia ou de neuropatia traumática, dor de neuropatia periférica, dor de neuropatia por aprisionamento, neuropatia causada por abuso de álcool, dor por infecção de HIV, dor de quimioterapia anticâncer ou

hipotireoidismo de esclerose múltipla, dor durante o trabalho de parto, dor resultante de queimaduras, incluindo queimaduras solares, dor pós-parto, enxaqueca, dor de angina e dor relacionada ao trato geniturinário incluindo cistite.

O termo "analgésico" conforme usado no presente documento se refere a um agente ativo que alivia a dor em um indivíduo. O termo "analgésico opiato" ou "analgésico opioide" se refere a um analgésico narcótico usado, por exemplo, como um adjunto para anestesia ou para aliviar a dor. O termo "analgésico não opiato" se refere a um agente não narcótico indicado para dor.

Uma "dose terapeuticamente eficaz" se refere à quantidade do agente ou agentes ativos que resulta em alcançar o efeito desejado. A toxicidade e eficácia terapêutica de tais agentes ativos são determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, determinando a LD50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico, que é expresso como a razão entre LD50 e ED50. Um alto índice terapêutico é preferencial. Os dados obtidos de tais dados são usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem dos agentes ativos, em um aspecto, se situa dentro de uma faixa de concentrações de circulação que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia dentro dessa faixa

dependendo da forma de dosagem empregada e da rota de administração utilizada.

"Administração concorrente," "administrado em combinação," "administração simultânea" ou frases similares significam que uma composição que compreende dois ou mais agentes é administrada concorrentemente ao indivíduo a ser tratado. Por "concorrentemente," é entendido que cada agente é administrado ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem em diferentes pontos no tempo. Todavia, se não forem administrados ao mesmo tempo, esses são, em um aspecto, administrados de suficientemente próximos em tempo, a fim de fornecer a potenciação desejada do efeito do tratamento. Os intervalos de dosagem adequados e ordem de dosagem com tais compostos serão prontamente aparentes para aqueles elementos versados na técnica. Também é contemplado que dois ou mais agentes são administrados em composições separadas e, em um aspecto, uma composição é administrada antes ou subsequente à administração do primeiro agente. A administração anterior se refere à administração dos agentes dentro da faixa de um dia (24 horas) antes do tratamento até 30 minutos antes do tratamento. É adicionalmente contemplado que um agente é administrado subsequente à administração do outro agente. A administração subsequente se destina a descrever a administração a partir de 30 minutos após a administração do primeiro agente até um dia (24 horas) após a administração do primeiro agente. O período de 30 minutos até 24 horas pode incluir a administração em 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20 ou 24 horas.

O termo "dose baixa" conforme usado no presente documento se refere a uma dose de um ingrediente ativo em uma composição, em que a quantidade de ingrediente ativo na composição é inferior do que aquela tipicamente dada no tratamento de um indivíduo. Por exemplo, a dose baixa de agente ativo pode ser administrada em combinação com um segundo agente ativo, tal que os agentes ativos exibam um efeito sinérgico e a dose de cada agente ativo no tratamento de combinação seja menor do que a dose necessária quando o agente não for administrado em combinação com um segundo ingrediente ativo.

Os analgésicos opioides e opiáceos disponíveis são derivados de cinco grupos químicos (isto é, fenantrenos, fenilheptilaminas, fenilpiperidinas, morfina e benzomorfanos). Farmacologicamente, os opiáceos e não opiáceos se diferem significativamente em atividade. Alguns são agonistas fortes (morfina), outros são agonistas moderados a brandos (codeína). Em contraste, alguns derivados de opiáceo exibem atividade agonista-antagonista misturada (nalbufina), enquanto que outros são antagonistas opiáceos (naloxona). A morfina é o protótipo dos analgésicos opiáceos e opioides, em que todos desses têm ações similares no sistema nervoso central.

A morfina é quimicamente derivada do ópio. Outros fármacos, como heroína, são processados a partir da morfina ou codeína. Tais opiáceos têm sido usados tanto medicamente quanto não medicamente durante séculos. No início do século 19, a morfina era extraída sob uma forma pura adequada para solução. Com a introdução da agulha hipodérmica, a injeção



de uma solução de morfina se tornou o método mais comum de administração. Dentre os vinte alcaloides contidos no ópio, apenas a codeína e morfina ainda estão em uso clínico amplamente difundido.

5        O grupo de ópio de fármacos narcóticos está entre os fármacos mais poderosamente atuantes e clinicamente úteis que produzem a depressão do sistema nervoso central. Os fármacos desse grupo são usados principalmente como analgésicos, mas possuem outras numerosas propriedades  
10    úteis. A morfina, por exemplo, é usada para aliviar a dor, induzir o sono na presença de dor, controlar a diarreia, suprimir a tosse, facilitar a dispneia e facilitar a anestesia.

      Quando a morfina e compostos relacionados são  
15    administrados ao longo de um grande período de tempo, a tolerância ao efeito analgésico se desenvolve e a dose, então, deve ser aumentada periodicamente para obter alívio de dor equivalente. Eventualmente, a tolerância e dependência física se desenvolvem que, combinadas com  
20    euforia, resultam em uso excessivo e vício daqueles pacientes que têm personalidades suscetíveis. Por esse motivo, a morfina e seus derivados devem ser usados somente como diretamente por um médico (isto é, não em maior dose, com mais frequência ou mais tempo do que o  
25    prescrito), e não devem ser usados para tratar dor quando um analgésico diferente é suficiente para tal.

      É contemplado que a centaquina é útil para potencializar os efeitos analgésicos de um analgésico opiato. Os analgésicos opiatos incluem, mas não se limitam

a, (a) ópio; (b) alcaloides de ópio, como morfina, sulfato de morfina sulfato, codeína, fosfato de codeína, sulfato de codeína, diacetilmorfina, cloridrato de morfina, tartrato de morfina e cloridrato de diacetilmorfina; e (c)  
5 analgésicos opiatos semissintéticos, como bromidrato de dextrometorfano, bitartrato de hidrocodona, hidromorfona, cloridrato de hidromorfona, tartrato de levorfanol, cloridrato de oximorfona e cloridrato de oxicodona.

É contemplado que o indivíduo tratado com o uso dos  
10 métodos descritos no presente documento é um indivíduo mamífero. O indivíduo mamífero pode ser um ser humano ou um modelo de animal não humano para pesquisa médica humana ou um animal de grande importância como gado ou animais de estimação, por exemplo, animais de companhia.

15 A administração da(s) composição(ões) farmacêutica(s) pode ser realizada antes, durante ou após o início da dor.

A presente invenção fornece métodos para aliviar e tratar sintomas que surgem em um indivíduo que sente a dor. Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento e  
20 prevenção de dor que compreende administrar a um mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina.

As causas de dor incluem, mas não se limitam a, inflamação, lesão, doença, espasmo muscular e o início de um evento ou síndrome neuropática. Uma dor aguda é  
25 usualmente autolimitada, enquanto que a dor crônica, em geral, persiste por 3 meses ou mais e pode levar a mudanças significantes na personalidade de um, estilo de vida, capacidade funcional e qualidade de vida geral. A dor tratada de forma ineficaz pode ser prejudicial à pessoa que

vivencia a mesma, limitando funções, reduzindo a mobilidade, complicando o sono e interferindo na qualidade de vida geral.

A dor inflamatória (nociceptiva) pode ocorrer quando o tecido é lesionado, conforme resultado de uma cirurgia ou devido a um evento físico, químico ou térmico adverso ou de uma infecção por um agente biológico. A dor neuropática é uma síndrome de dor persistente ou crônica que pode resultar de uma lesão do sistema nervoso, dos nervos periféricos, do gânglio da raiz dorsal ou raiz dorsal ou do sistema nervoso central. As síndromes de dor neuropáticas incluem alodinia, várias neuralgias como neuralgia pós-herpética e neuralgia trigeminal, dor fantasma síndromes de dor regional complexa, como distrofia simpático-reflexa e causalgia. A causalgia é caracterizada por dor ardente espontânea combinada com hiperalgesia e alodinia. A hiperalgesia é caracterizada por sensibilidade extrema a um estímulo doloroso. (Meller et al., Neuropharmacol. 33:1.471 a 1.478, 1994). Essa condição pode incluir hiperalgesia visceral que gera a sensação de dor nos órgãos internos. A dor neuropática também inclui hiperpatia, em que o estímulo que é normalmente inofensivo se proporcionado durante um período de tempo prolongado resulta em dor severa.

O tratamento de dor crônica em pacientes humanos é executado, em geral, conforme descrito na patente nº U.S. 6.372.226. Em um aspecto, um paciente que vivencia a dor inflamatória aguda, dor neuropática, condições convulsivas ou outra dor crônica a partir de uma lesão é tratado por administração intratecal, por exemplo, por punção lombar na

região lombar, com uma dose apropriada de uma composição descrita no presente documento para o uso em um método da invenção. Em um exemplo adicional, se o indivíduo sofrer de artrite ou outra dor na articulação, as composições são administradas intra-articularmente. A dose particular sítio de injeção, bem como a frequência de administrações, depende de uma variedade de fatores dentro da habilidade do médico envolvido.

O melhoramento de sintomas de dor é medido com o uso de métodos conhecidos na técnica, incluindo a escala analógica visual (VAS), a escala de classificação verbal (VRS) e a escala de classificação numérica (NRS) (Williamson et al., J Clin Nurs. 14:798 a 804, 2005; Carlsson, A., Pain. 1983 16:87 a 101, 1983). Para a escala analógica visual, a escala de classificação verbal e a escala de classificação numérica, em geral, os pacientes são perguntados para classificarem sua dor em uma escala numérica antes e depois do estímulo da dor. A dor cônica também é avaliada por um teste escalonado objetivo como o Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) Pain Scale (Bennett, M. Pain. 92:147 a 157, 2001). Uma diminuição na hipersensibilidade ao estímulo de dor após o tratamento com uma composição que compreende um agonista adrenérgico  $\alpha_2$  e/ou um antagonista receptor de endotelina indica que interferindo na atividade normal, receptores adrenérgico  $\alpha_2$  e/ou receptores de endotelina aliviam os sintomas associados à dor crônica. Em outro aspecto da invenção, as composições descritas no presente documento são administradas em conjunto com outras medicações para

dor conforme descrito acima, em que as terapias fornecem um efeito sinérgico no alívio de sintomas de dor crônica.

O aperfeiçoamento na dor é medido em pontos de tempo diferentes após a administração de analgésico ser  
5 administrada e a redução na dor baseada na escala de medição é avaliada. Em uma modalidade, a avaliação dos sintomas de dor é executada a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 8 semanas, ou conforme determinada por um medico envolvido. Em uma modalidade, o aperfeiçoamento nos sintomas de dor em  
10 um indivíduo, quando comparado com a avaliação dos sintomas de dor antes do tratamento, pode ser pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo  
15 menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100% conforme medido com o uso de escalas de dor reconhecidas na técnica.

Como um aspecto adicional, a invenção inclui kits que compreendem um ou mais compostos ou composições empacotados  
20 em um modo que facilita seu uso para métodos práticos da invenção. Em uma modalidade ais simples, tal kit inclui um composto ou composição descrito no presente documento como útil para a prática de um método da invenção (isto é, centaquina), empacotado em um recipiente como um garrafa ou  
25 vaso vedado, com uma etiqueta fixada ao recipiente ou incluída no pacote que descreve o uso do composto ou composição para a prática do método da invenção. De preferência, o composto ou composição é empacotado em uma forma de dosagem unitária. O kit pode incluir

adicionalmente um dispositivo adequado para administrar a composição de acordo com uma rota de administração preferencial.

Os dados nas Figuras 9 a 13 mostram que:

- 5 (a) centaquina (0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg, iv) produziu analgesia dependente de dose;
- (b) centaquina (0,3 e 0,9 mg/kg, iv) potencializou a analgesia com morfina;
- (c) o efeito analgésico de centaquina (0,3 mg/kg, iv) foi
- 10 comparável à dose de 4 mg/kg de analgesia com morfina; e
- (d) o efeito analgésico de centaquina (0,9 mg/kg, iv) foi significativamente maior do que a dose de 4 mg/kg de analgesia com morfina.

#### Referências

- 15 LG Hegde et al. *Pharmacol Res* 36: 109 a 114 (1997).
- A Gulati et al. *Eur J Pharmacol* 231 : 151 a 156 ( 1993).
- RC Srimal et al. *Pharmacol Res* 22:319 a 329 (1990).
- M Bhatnagar et al. *Arzneimittel-Forschung* 35:693 a 697 (1985).
- 20 A Gulati et al. *Drug Development Research* 23:307 a 323 (1991).
- A Murti et al. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 28B, 934 (1989).

#### 25 Métodos para Tratar Choque Hemorrágico Ressuscitativo

A presente invenção também é direcionada a métodos de tratamento de choque hemorrágico ressuscitativo que compreende a administração de uma quantidade

terapeuticamente eficaz de centaquina a um indivíduo em necessidade do mesmo.

Em geral, o choque hemorrágico é sinalizado por uma redução crítica na perfusão tecidual, levando à acidose  
5 tecidual e hipoxia, comprometendo a atividade metabólica celular e a função celular e de órgãos. A hiporreatividade a vasoconstritores durante o choque hemorrágico foi documentada. Os estados de choque hemorrágico que variam de  
brando a severo abrangem inúmeros processos  
10 patofisiológicos, imunológicos e metabólicos. Um aumento em déficit de base durante o choque traumático se correlaciona bem com falência múltiplas dos órgãos e um estado de descompensação seguido pela mortalidade em seres humanos. O déficit de base foi comparado às variáveis hemodinâmicas  
15 incluindo pressão arterial média, frequência cardíaca e débito cardíaco. As alterações na entrega e consumo de oxigênio durante a reanimação que aperfeiçoaram uma compensação de choque são precisamente refletidas nas alterações de déficit de base. Enquanto que o déficit de  
20 base é um indicador de tensão metabólica com início e progressão de choque, as células musculares lisas e endoteliais nos vasos sanguíneos podem liberar inúmeros vasomediadores com lesão e princípio de perda de sangue.

Entretanto, as informações limitadas estão disponíveis  
25 para definir o papel dos vasomediadores no estado de descompensação vascular durante o choque hemorrágico. Uma elevação na concentração de plasma de circulação ET-I foi observada. Não é evidente se a duração de choque hemorrágico está ou não correlacionada com os níveis de ET-

I sistêmicos ou regionais (locais) durante estados diferentes de choque hemorrágico. É possível que uma necessidade de compensação rápida para o volume de perda de sangue durante o choque hemorrágico estimule a produção de ET-I que, por sua vez, pode modular os receptores adrenérgicos. Portanto, a centaquina foi usada como um agente adrenérgico como um componente principal de uma solução de reanimação para o tratamento de condições associadas a estados compensatórios e descompensatórios de choque hemorrágico. O método não está limitado ao choque hemorrágico, mas pode ser usado para tratar qualquer choque devido à insuficiência circulatória.

A Figura 14 mostra a mudança de dobra na expressão de receptores de  $ET_A$  normalizada para  $\beta$ -actina avaliada por densitometria. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  comparado a um controle de veículo. Mais particularmente, a Figura 14 é uma imunotransferência que mostra a expressão de  $ET_A$  em um cérebro de rato (Lane-2 a Lane-4) e aorta abdominal (Lane-5 a Lane-7) após 1 h de tratamento com clonidina. Lane-1: Marcador de proteína; Lane-2: Tratamento com veículo; Lane-3: Tratamento com clonidina ( $10 \mu\text{g.mf}^{-1}$ ); Lane-4: tratamento com clonidina ( $90 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ); Lane-5: Tratamento com veículo; Lane-6: Tratamento com clonidina ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ); Lane-7: Tratamento com clonidina ( $90 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). O método de blot é representativo de quatro experimentos diferentes com resultados similares (A). O gráfico de barras que mostra a mudança de dobra na expressão de  $ET_A$  em cérebro de rato e aorta abdominal normalizada para  $\beta$ -actina avaliada por



densitometria. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM, com n=4 ratos em cada grupo.  $p<0,05$  comparado com tratamento com veículo.

A Figura 15 mostra os níveis de lactato em ratos reanimados com lactato de Ringer e centaquina em um modelo de choque hemorrágico. Os valores para lactato são expressos como média  $\pm$  SEM. Com n=5 ratos/grupo. # $p<0,05$  comparado com a linha de base e \* $p<0,05$  comparado a LR-100 e nível de lactato de linha de base após a indução de choque. LR-100 não é eficaz em reverter os níveis de lactato de sangue. LR-300 é eficaz na redução dos níveis de lactato de sangue. Os gráficos mostram uma queda em lactato (mmol/l) com administração de 0,05 a 0,45 mg/kg de centaquina. As doses inferiores de centaquina foram mais eficazes do que as doses superiores.

A Figura 16 mostra o déficit de base padrão (mEq/l) ao longo do tempo para ratos reanimados com lactato de Ringer e centaquina em modelo de choque hemorrágico. Os valores para déficit de base são expressos como média  $\pm$  SEM com n=5 ratos/grupo. # $p<0,05$  comparado com linha de base,  $\uparrow$ ,  $\downarrow$ ,  $p<0,05$  comparado com base de linha de base após choque hemorrágico ( $\uparrow$ -alto déficit de base,  $\downarrow$ -baixo déficit de base).

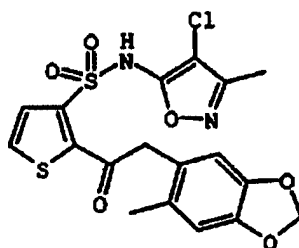
A Figura 17 mostra o aperfeiçoamento no tempo de sobrevivência para ratos reanimados com lactato de Ringer e centaquina no modelo de choque hemorrágico. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM com n>5 ratos/grupo. \* $p<0,05$  comparado a LR-100. # $p<0,05$  comparado com LR-300. Os dados

mostram um aumento no tempo de sobrevivência quando a centaquina é administrada com LR-100.

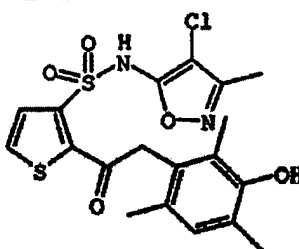
As Figuras 18 e 19 são ciclos de volume de pressão para reanimar ratos com LR-100 e LR-300 ao longo do tempo, respectivamente. A Figura 20 contém ciclos de volume de pressão que mostram o efeito de reanimação com LR-100 e centaquina (0,05 mg/kg). O aperfeiçoamento através da administração de centaquina em adição a LR-100 é observado pela comparação dos ciclos de volume de pressão da Figura 20 em relação aos ciclos da Figura 18.

ADENDO A

ANTAGONISTAS DE ET<sub>A</sub> SELETIVOS

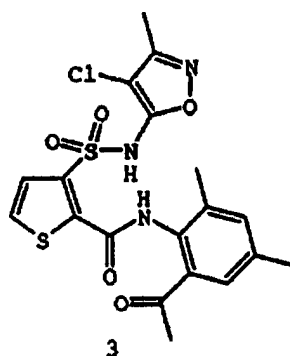


1 sitaxsentano



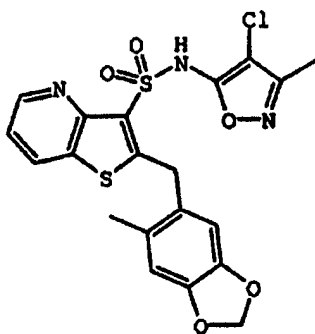
2

TBC2576

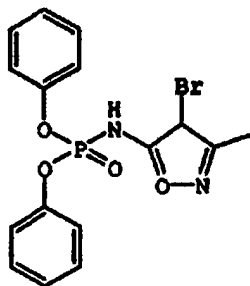


3

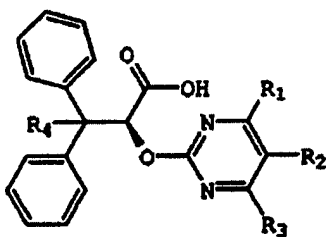
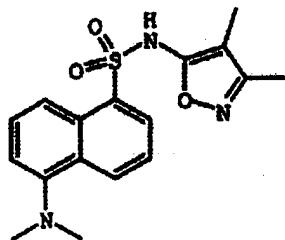
TBC3214



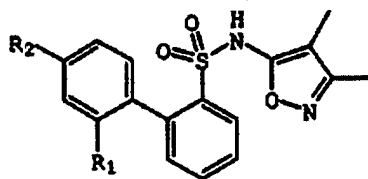
4



5

6  $R_1=R_3=R_4=CH_3$ ,7  $R_2=H$   $R_1=R_3=R_4=OCH_3$ ,  $R_2=F$ 8  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=CH_3$ ,  $R_4=-OCH_2CON(CH_3)C_6H_5$ 

9 BMS 182,874

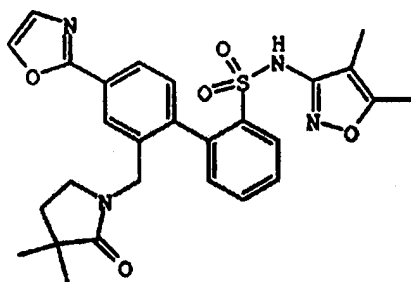
10  $R_1=CH_2OH$ ,  $R_2=H$ 11  $R_1=H$ ,  $R_2=2\text{-oxazolyl}$

12  $R_1=H$ ,  $R_2=2$ -pirimidinil

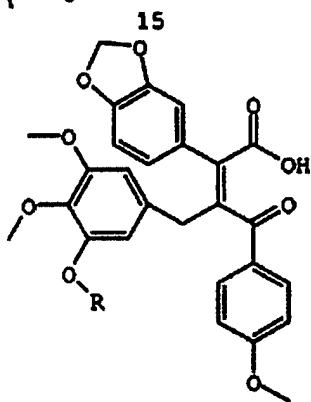
13  $R_1=H$ ,  $R_2=4$ -metoxietoximetil-4-oxo-1,2,4-triazol-2-ila

14  $R_1=H$ ,  $R_2=1,3$ -dialo-2-butil-4-oksospiro (4,4) -1-nonen-3-

ilmetila

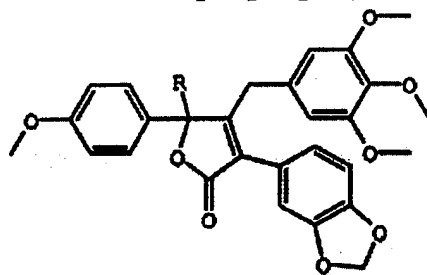


5



16  $R=CH_3$  (PD156707)

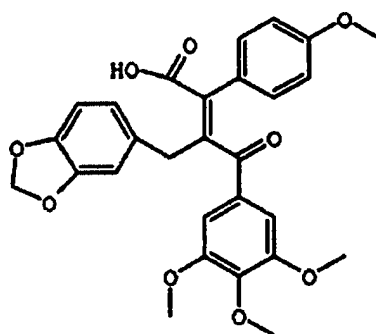
17  $R=CH_2CH_2CH_2SO_3H$



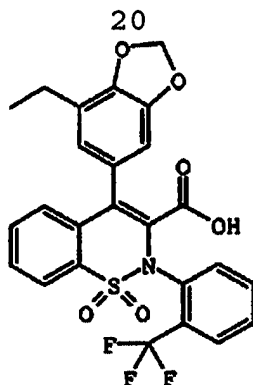
10

18  $R=OCH_2CH_2CH_2SO_3H$

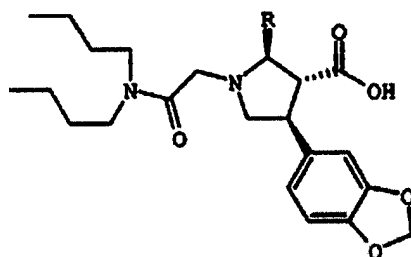
19  $R=OCONHCH_2CO_2C_2H_5$



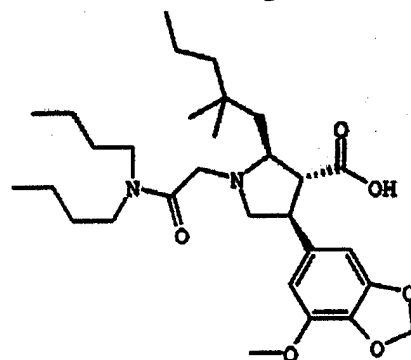
20



21 PD180988

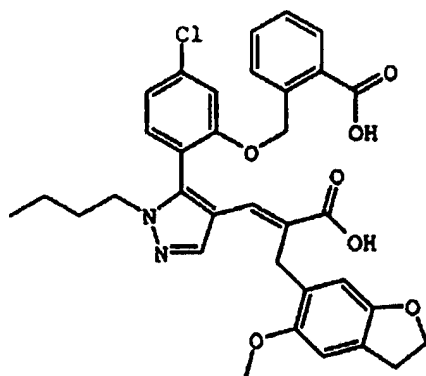


5

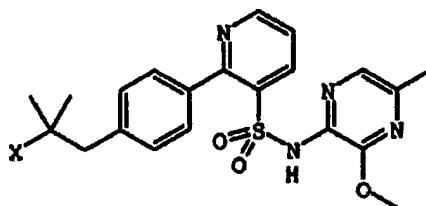
22 R=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-4-OCH<sub>3</sub> (ABT-627)23 R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-2-piridila

24

ABT-546

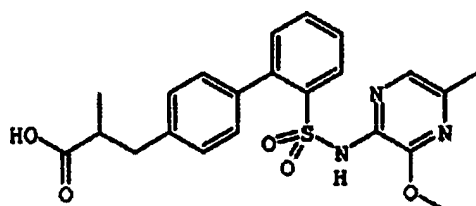


25 SB247083

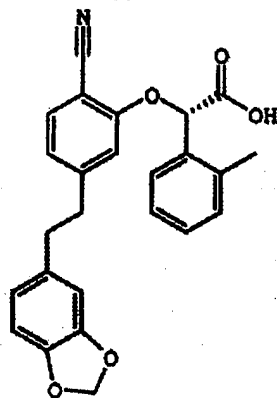
26 X=CO<sub>2</sub>H (Z1611)

5

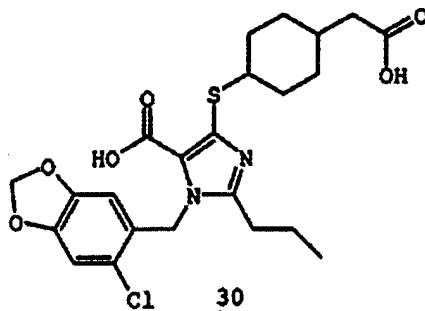
27 X=H



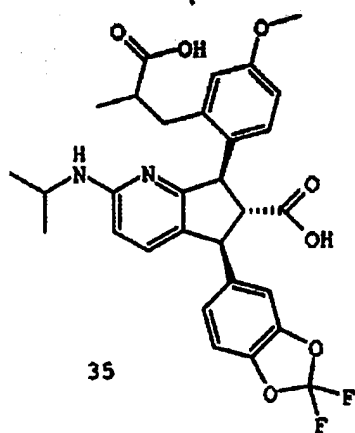
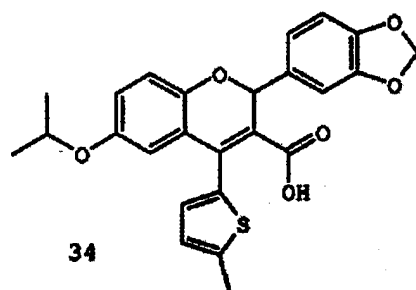
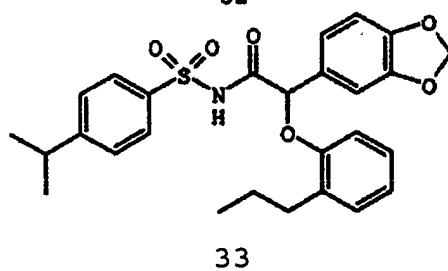
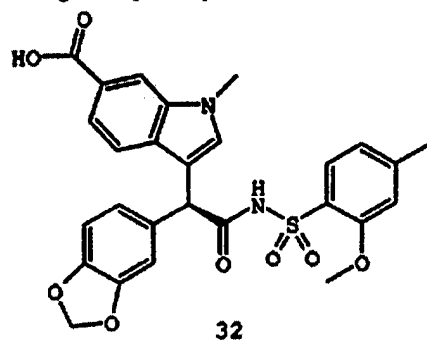
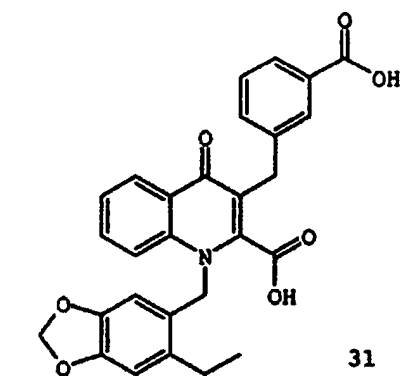
28



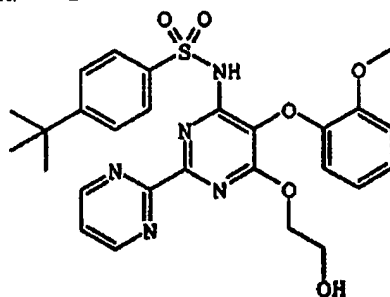
RPR118031A 29



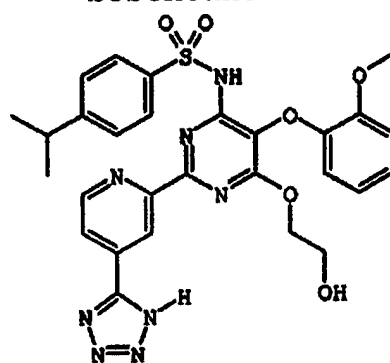
30



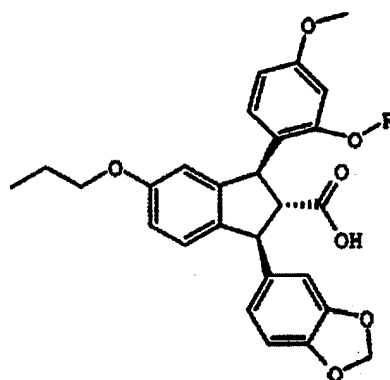
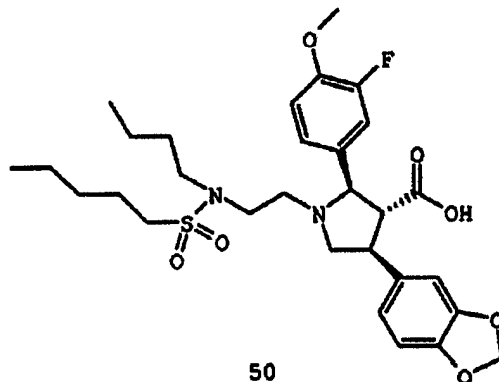
ADENDO B

BANTAGONISTAS DE ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> EQUILIBRADOS

bosentano 46

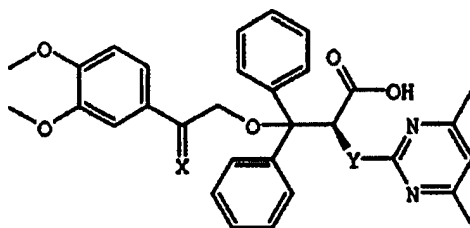


47

48 R=CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H SB20967049 R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH SB217242

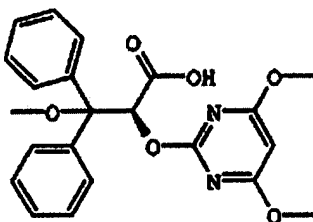
50



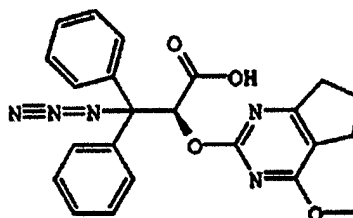


51  $X=H_2$  ,  $Y=CH_2$  S-LU 302872

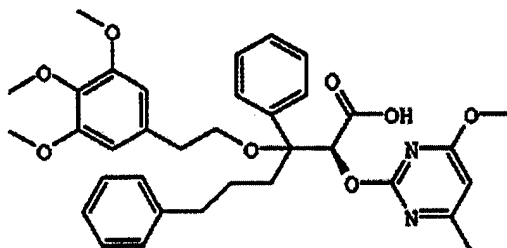
52  $X=O$  ,  $Y=O$



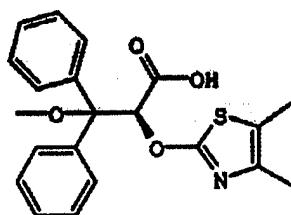
53



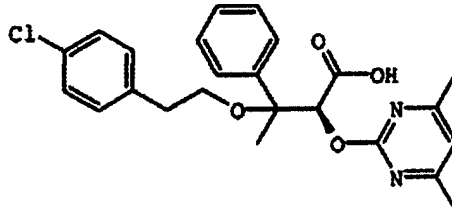
54



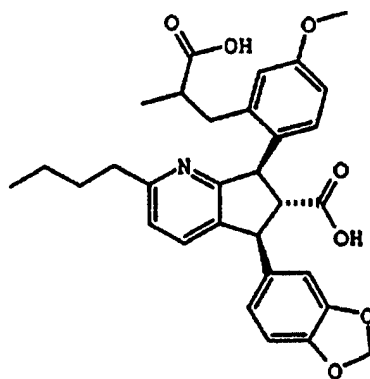
55



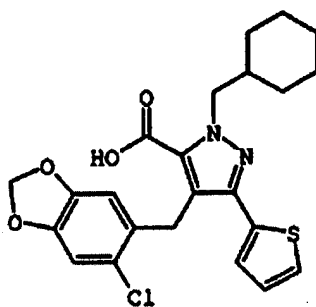
56



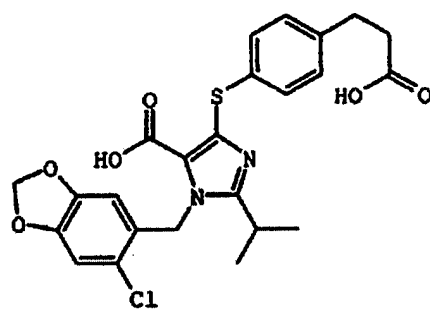
57



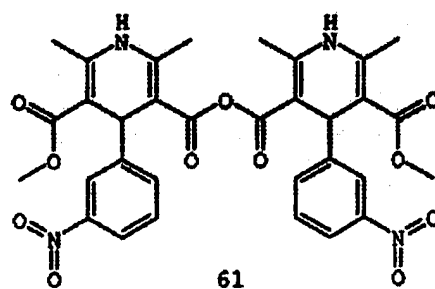
J-104132 58



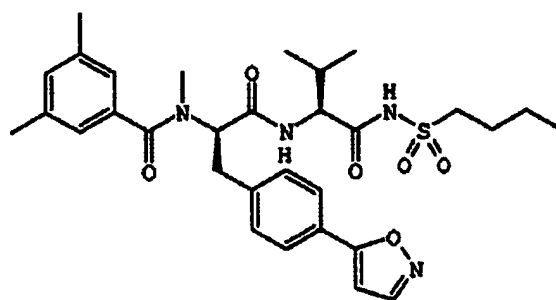
59



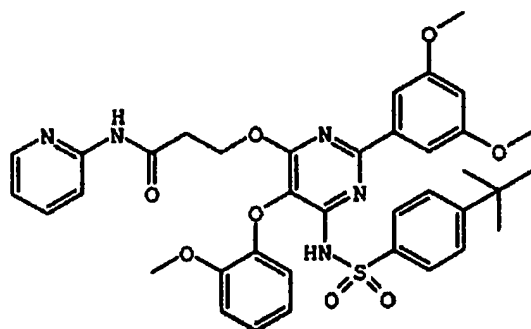
60



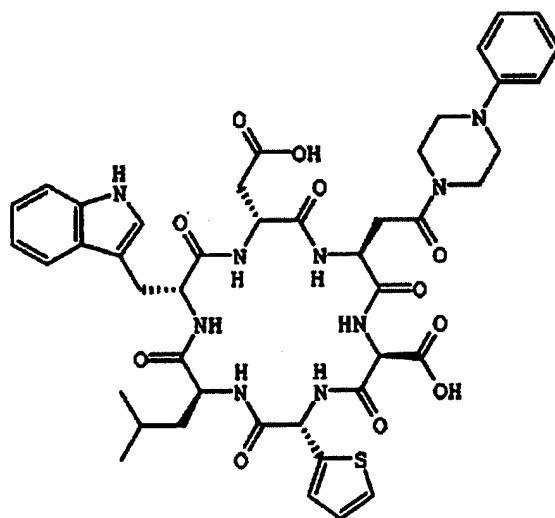
61



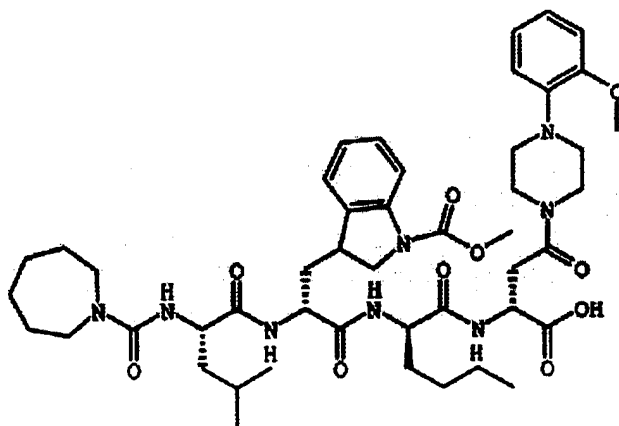
62



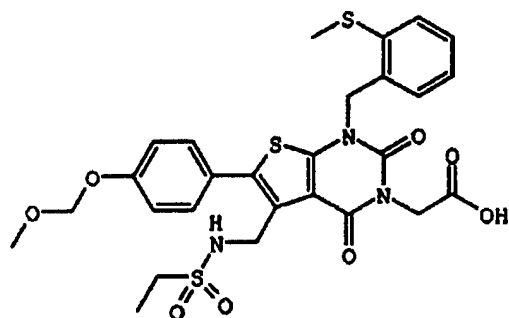
63



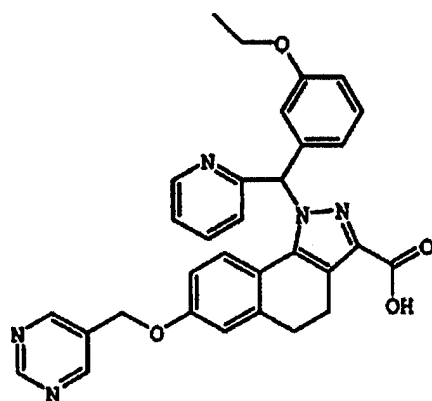
TAK-O 44 64



65

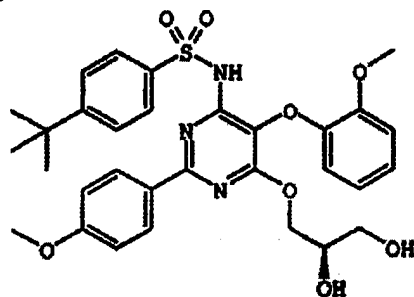


66

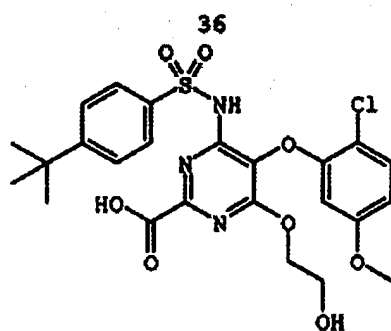


67

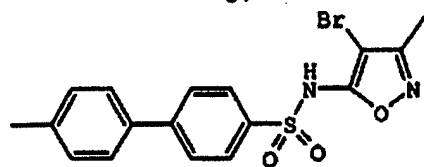
ADENDO C

5 ANTAGONISTAS DE ET<sub>B</sub> SELETIVOS

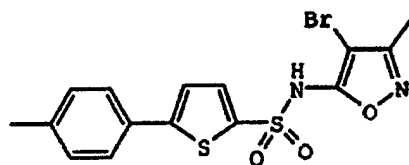
Ro 46-8443



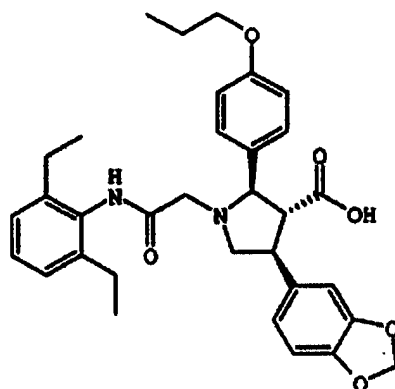
37



TBC10950 38

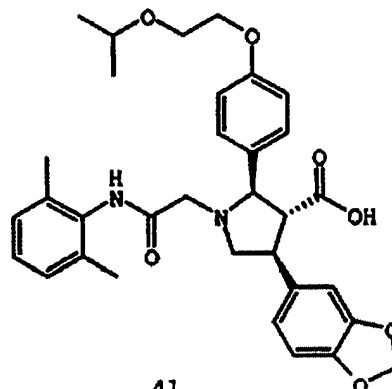


39

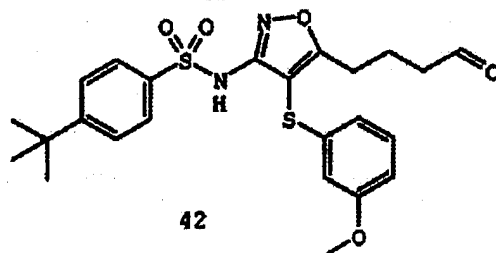


A192621

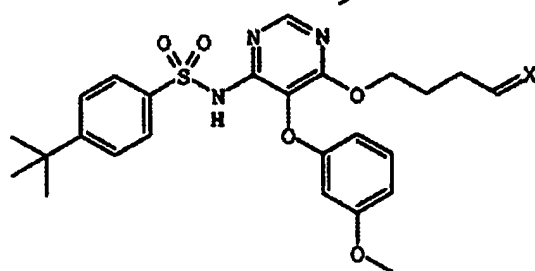
40



41

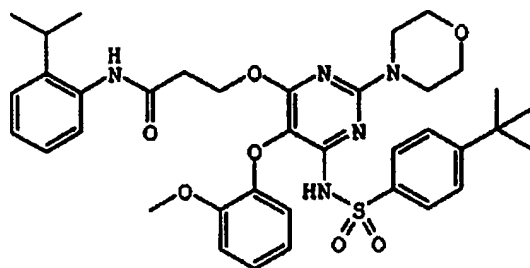


42



43 X=O

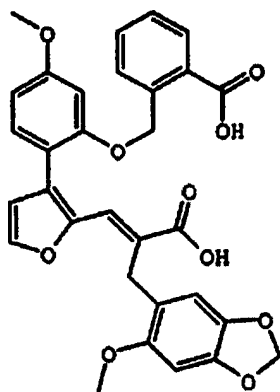
44 X=NNHCO-3-piridil



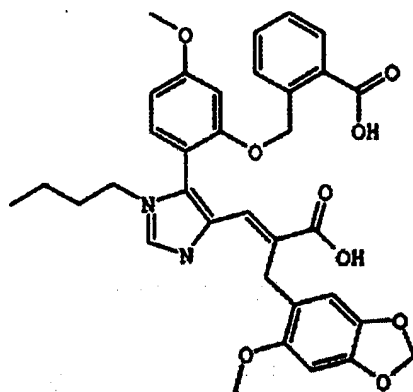
45

ADENDO D

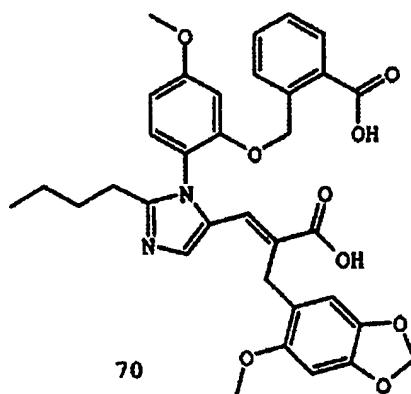
ANTAGONISTAS ET MISTURADOS



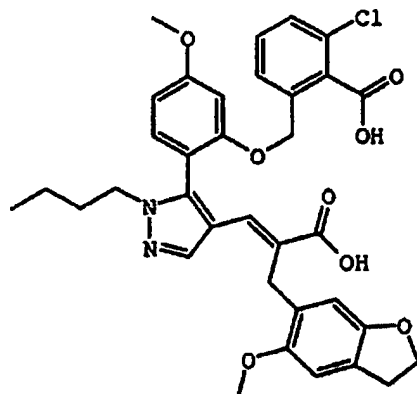
68



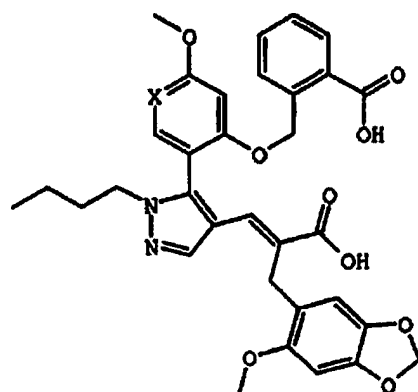
69



70

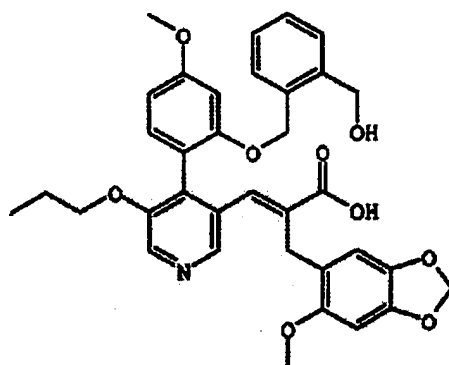


71

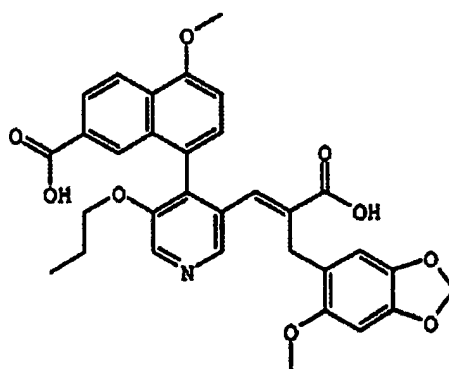


72 X=C

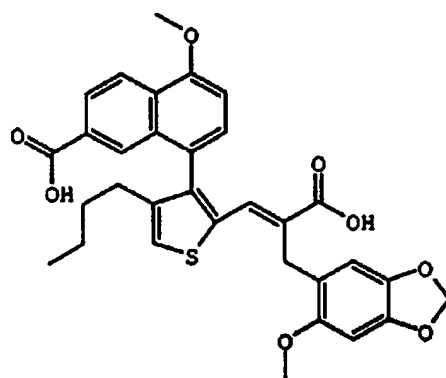
73 X=N



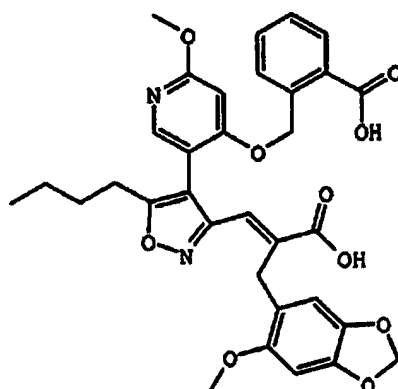
74



75

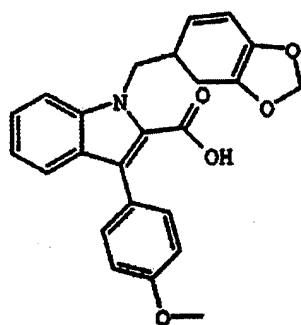


76

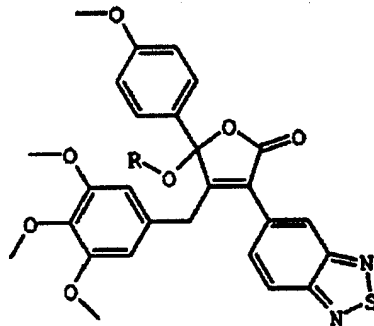


5

77



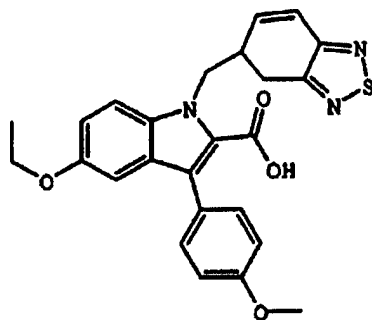
78



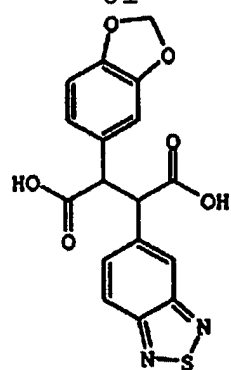
79 R=H

80 R=CONHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

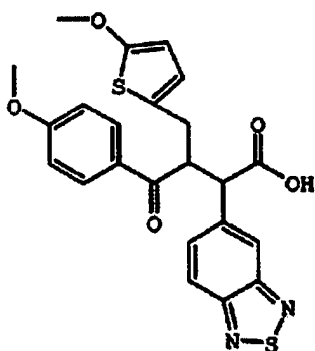




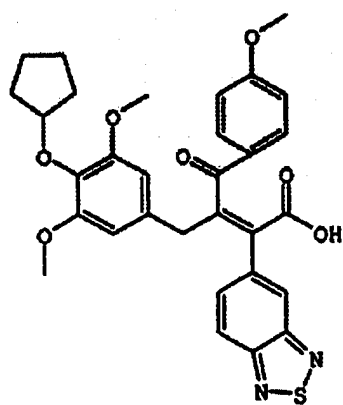
81



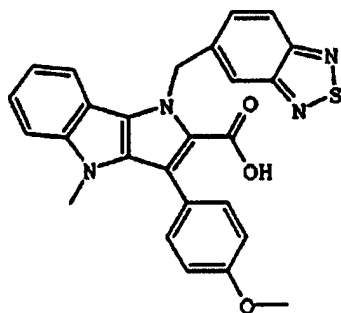
82



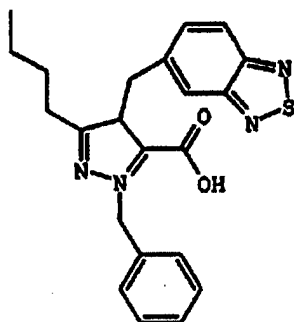
83



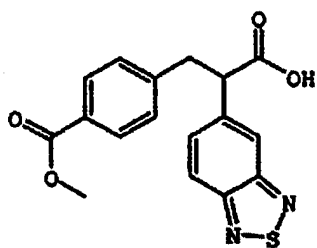
84



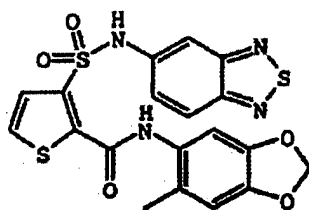
85



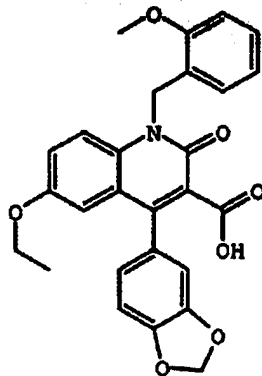
86



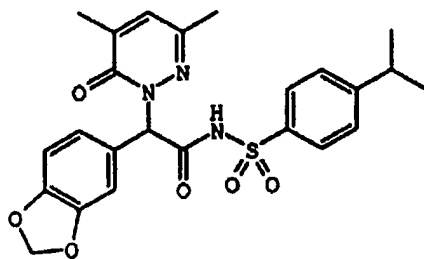
87



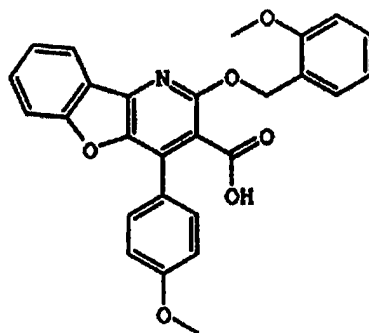
88



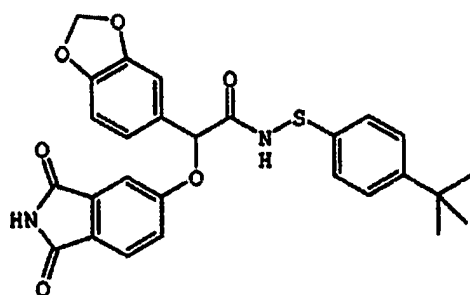
89



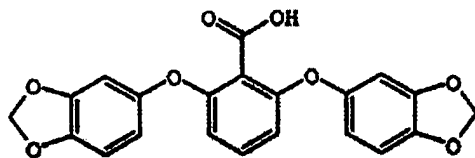
90



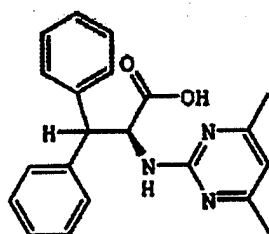
91



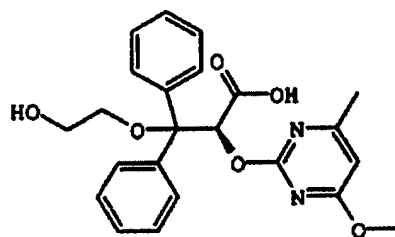
92



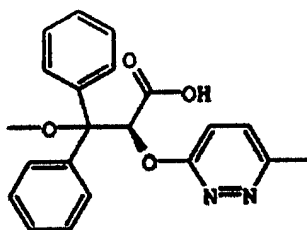
93



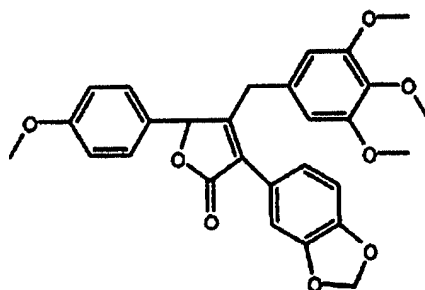
94



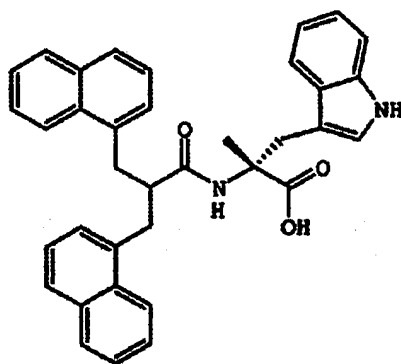
95



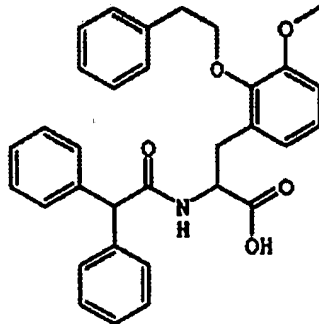
96



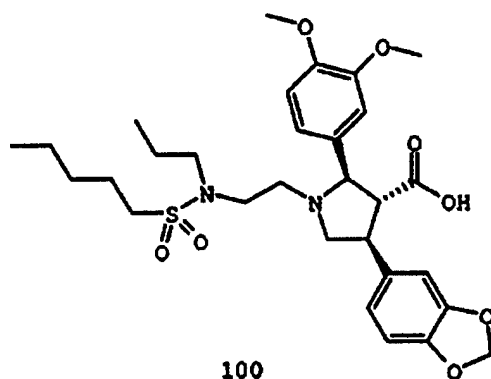
97



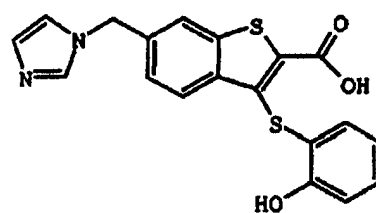
98



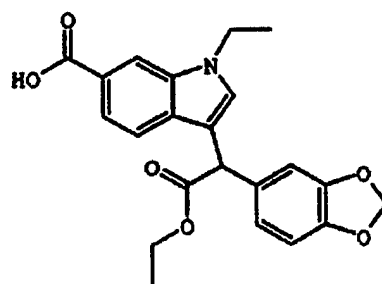
99



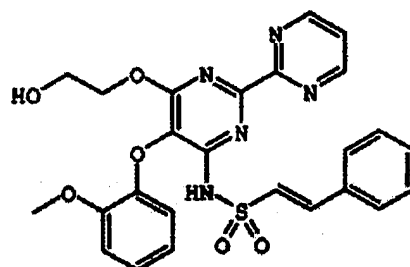
100



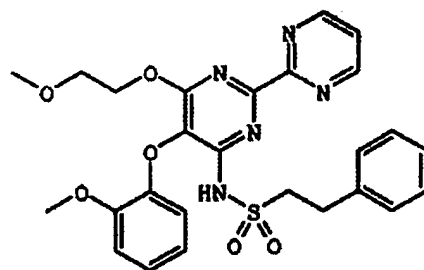
101



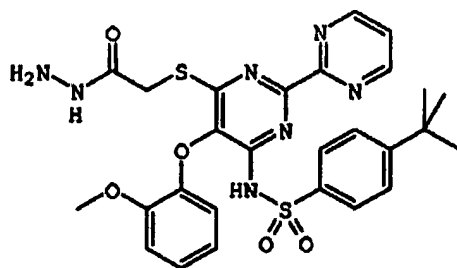
102



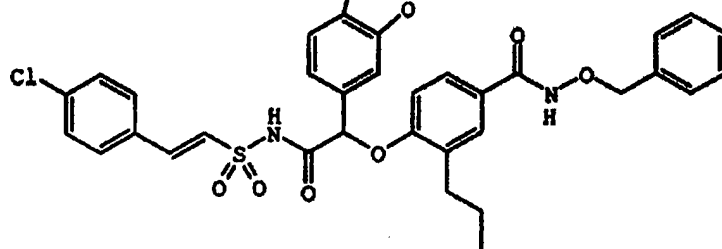
103



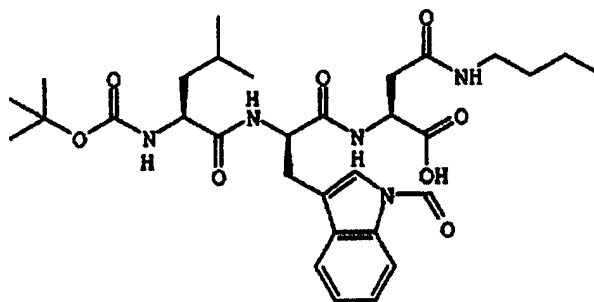
104



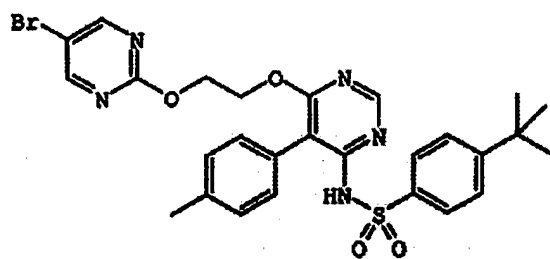
105



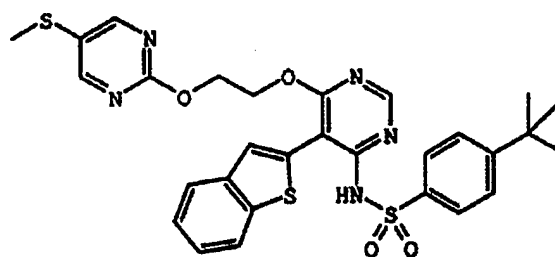
106



107



108



109

As modificações e variações da invenção conforme apresentadas anteriormente no presente documento podem ser feitas sem que se afaste do espírito e escopo do mesmo, e, portanto, apenas tais limitações devem ser impostas  
5 conforme indicadas pelas reivindicações em anexo.

**REIVINDICAÇÕES:**

1. Uso de centaquina **caracterizado** pelo fato de ser para a produção de um medicamento para o tratamento de choque hemorrágico ressuscitativo ou choque devido à  
5 insuficiência circulatória em um mamífero.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a centaquina é administrada com lactato de Ringer.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1,  
10 **caracterizado** pelo fato de que a centaquina é administrada em uma dose de 0,05 a 0,45 mg/kg.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a centaquina é administrada em uma dose de 0,05 a 0,15 mg/kg.

15 5. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o lactato de Ringer é administrado em uma quantidade volumétrica de 100% de uma quantidade volumétrica de perda de sangue (LR-100).

20 6. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o lactato de Ringer é administrado em uma quantidade volumétrica de 300% de uma quantidade volumétrica de perda de sangue (LR-300).



Fig. 1

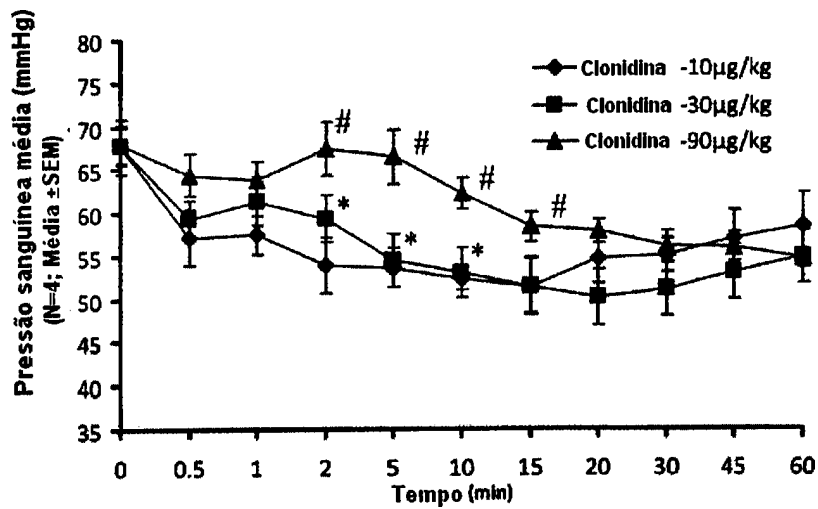


Figura 1A

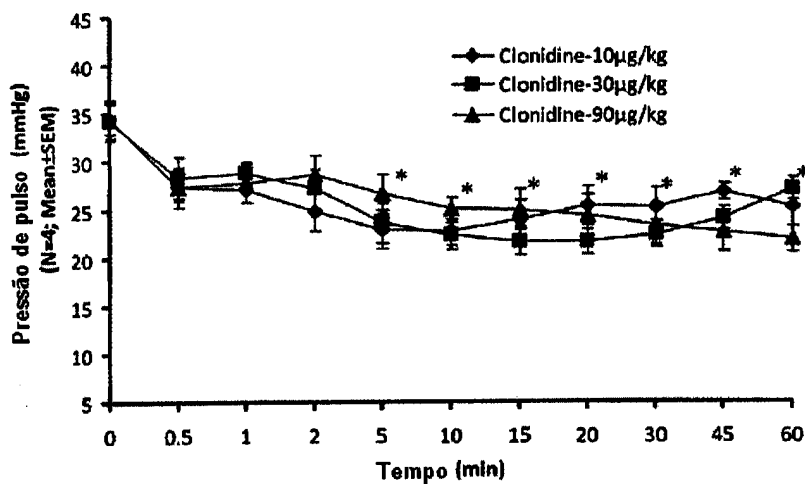


Figura 1B

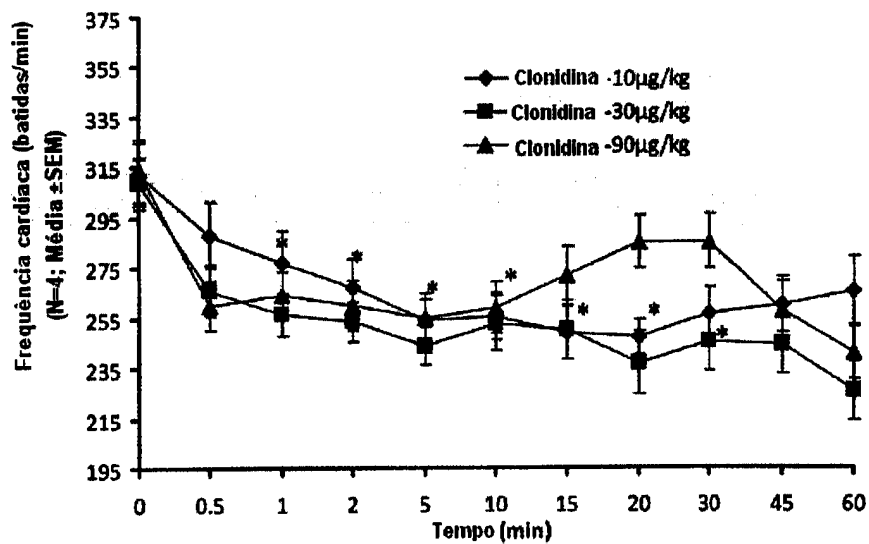


Figura 1C

Figura 2

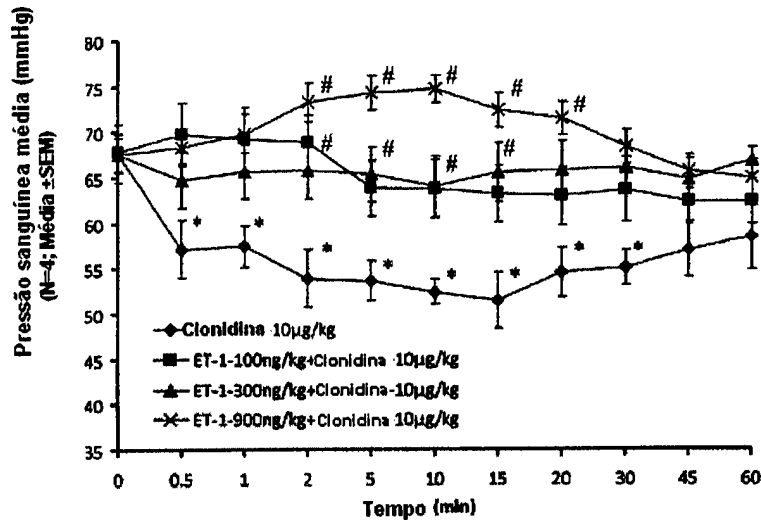


Figura 2A

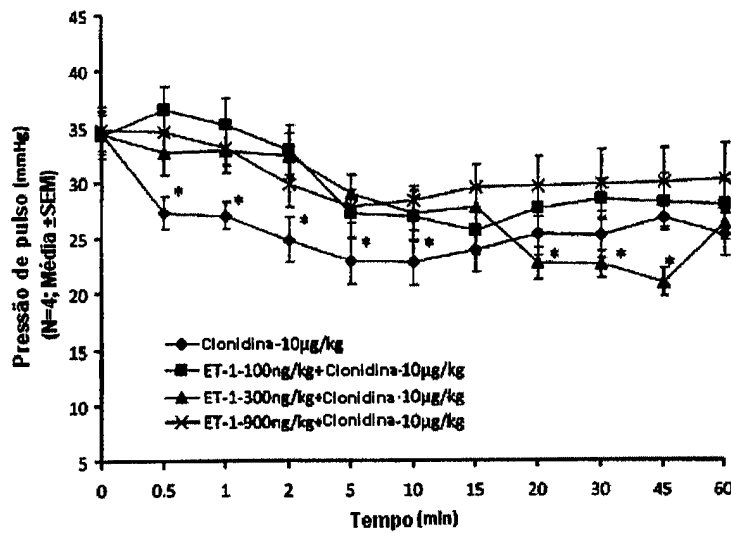


Figura 2B

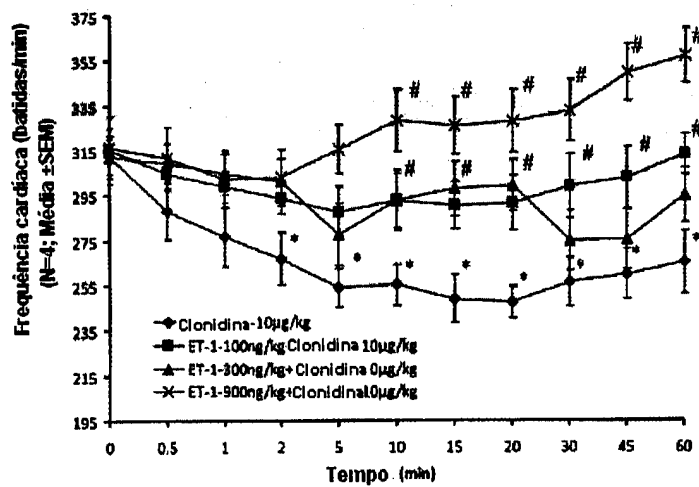


Figura 2C

Figura 3

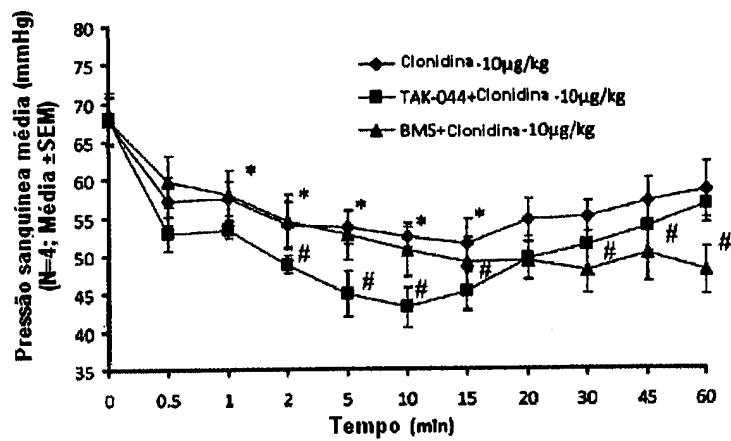


Figura 3A

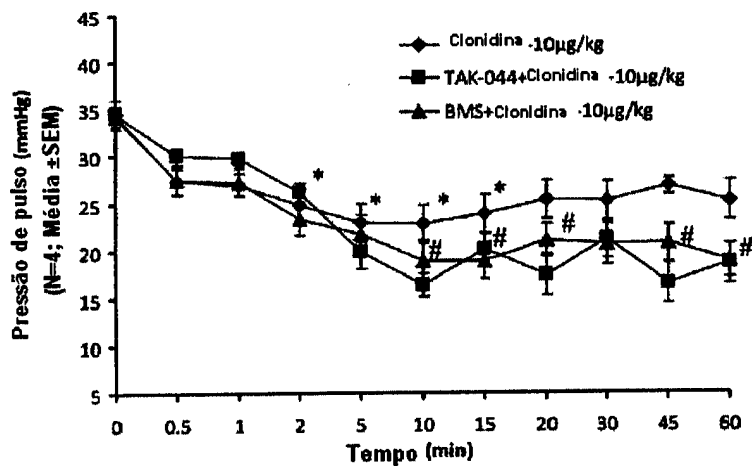


Figura 3B

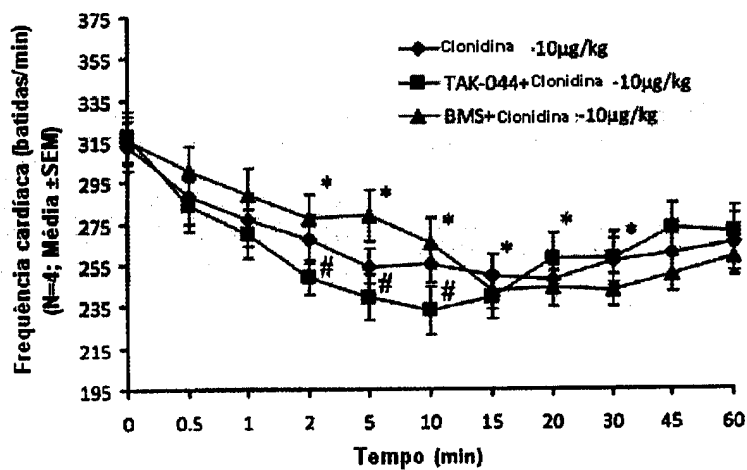


Figura 3C

Figura 4

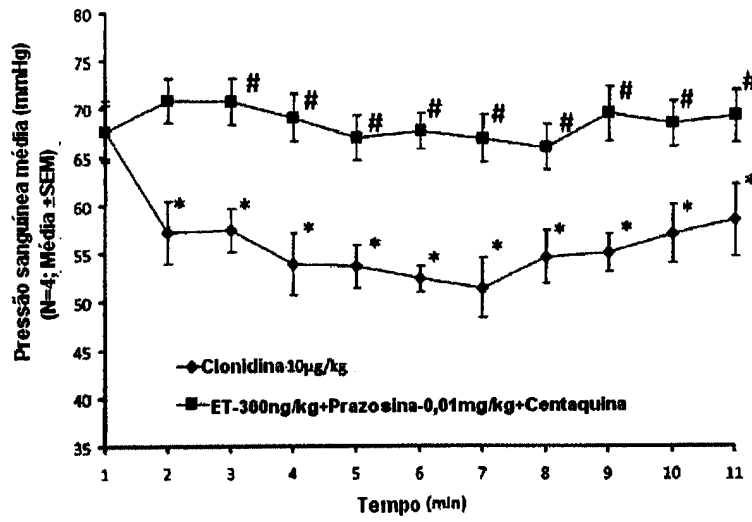


Figura 4A

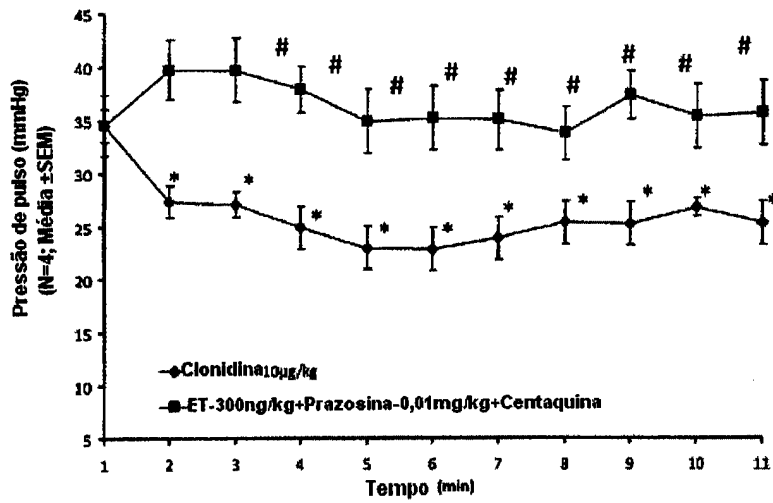


Figura 4B

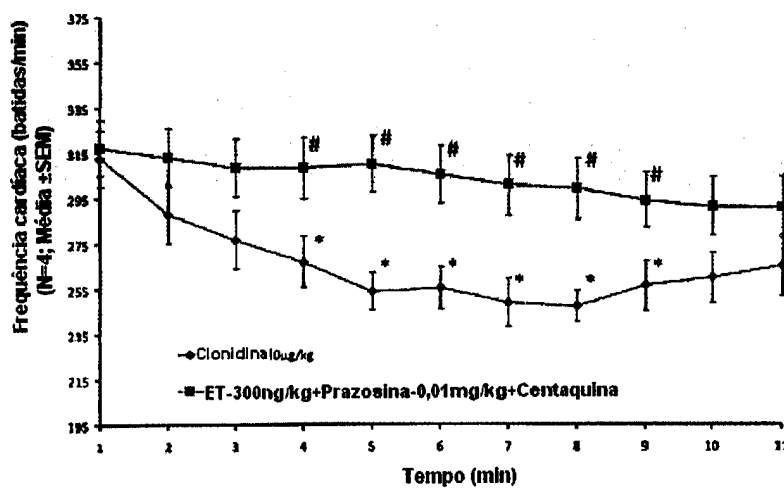


Figura 4C

Figura 5

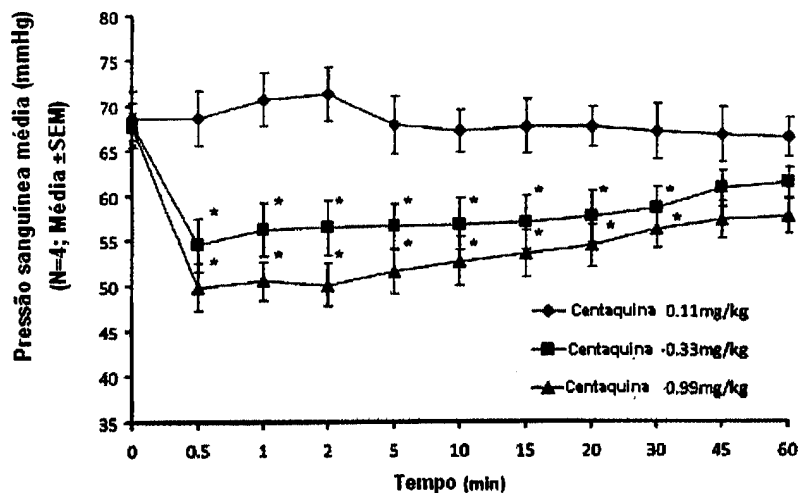


Figura 5A

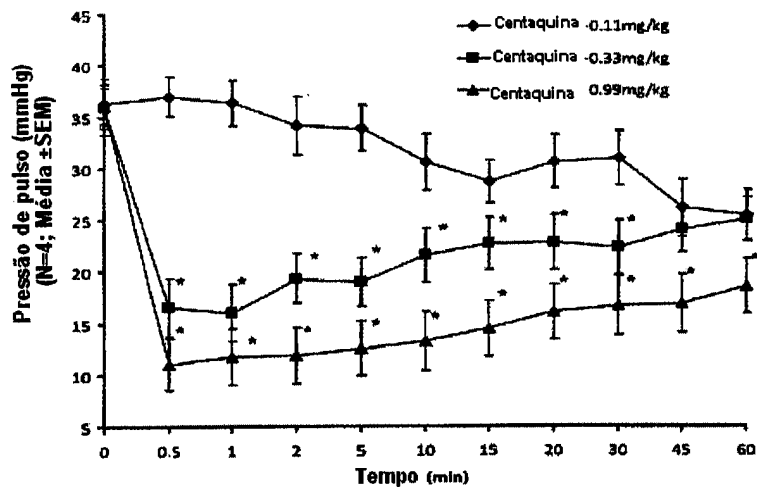


Figura 5B

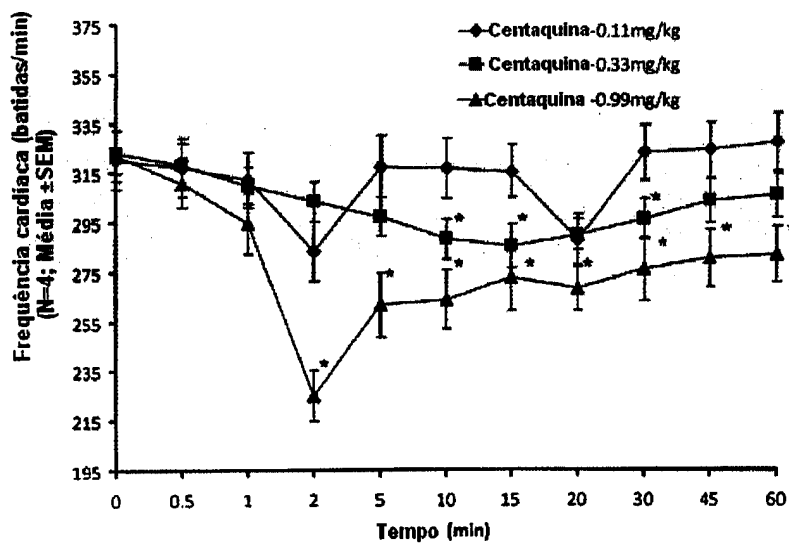


Figura 5C

Figura 6

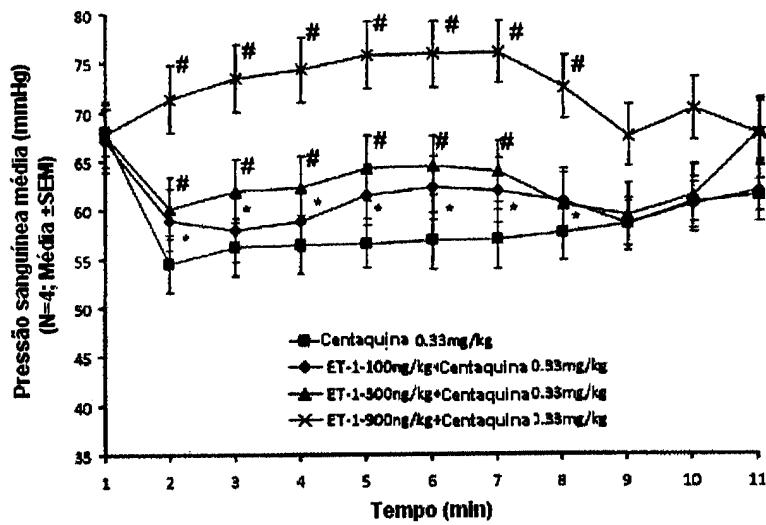


Figura 6A

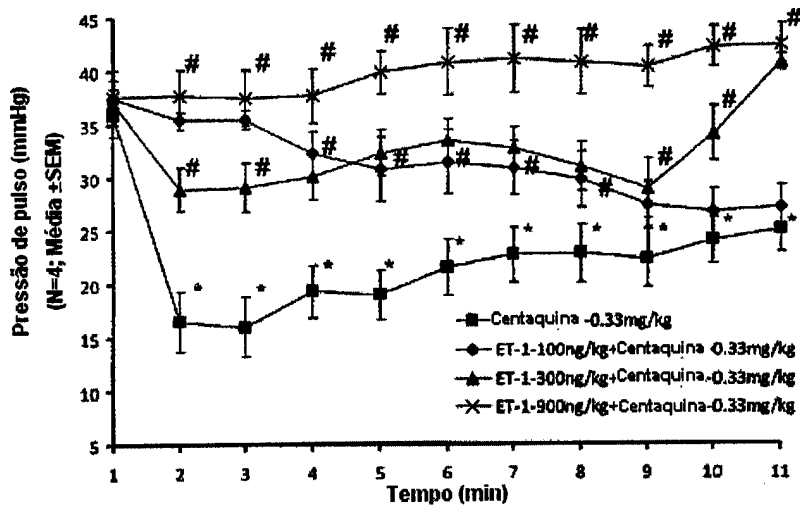


Figura 6B

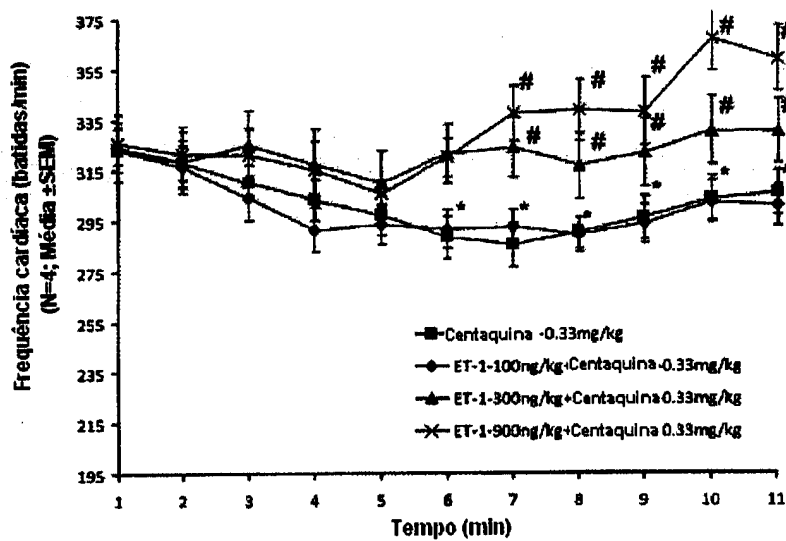


Figura 6C

Figura 7

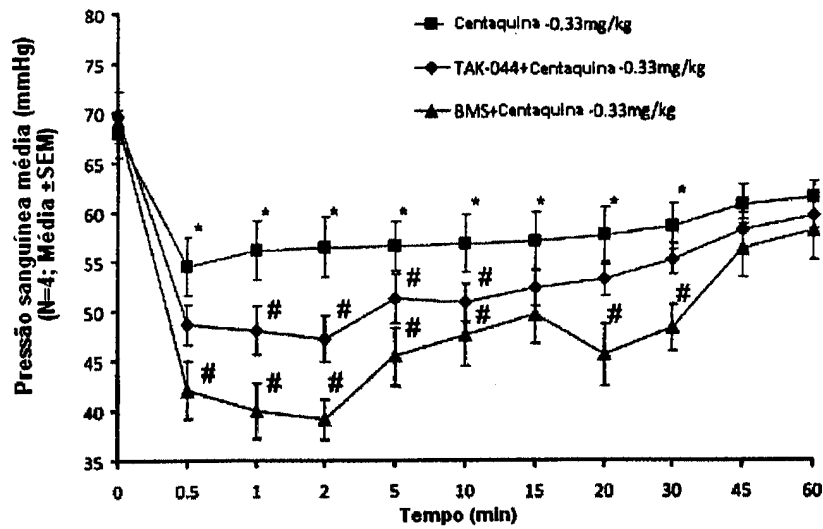


Figura 7A

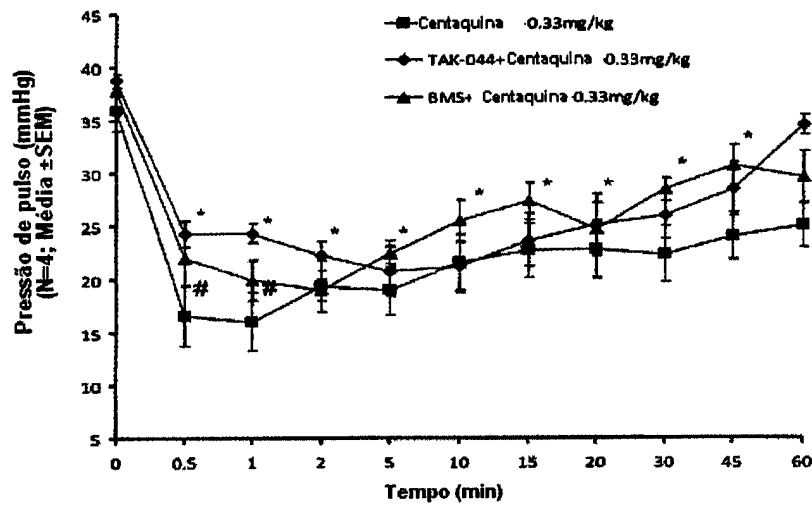


Figura 7B

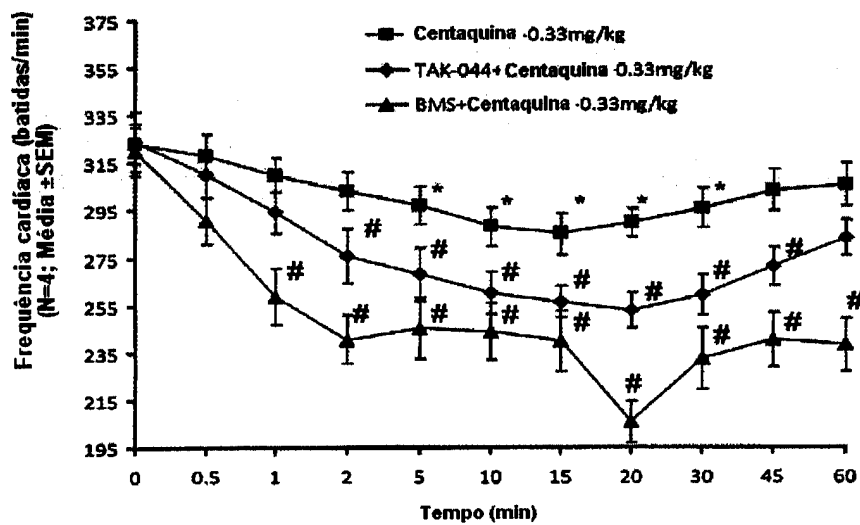


Figura 7C

Figura 8

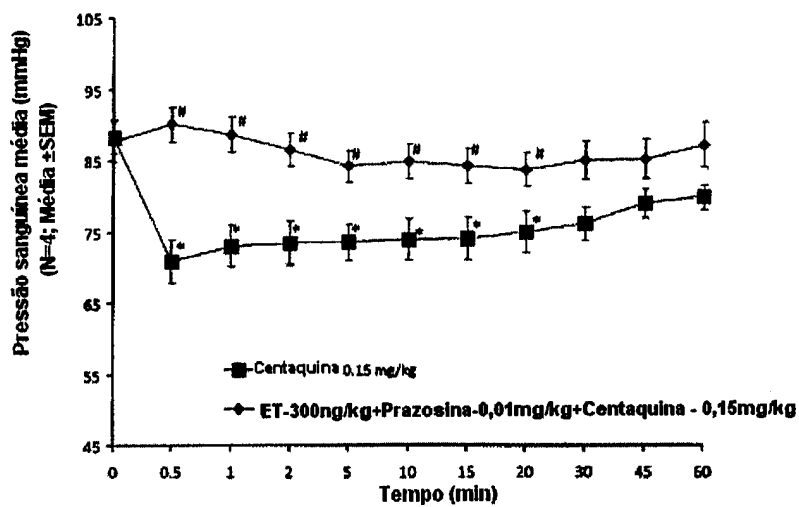


Figura 8A

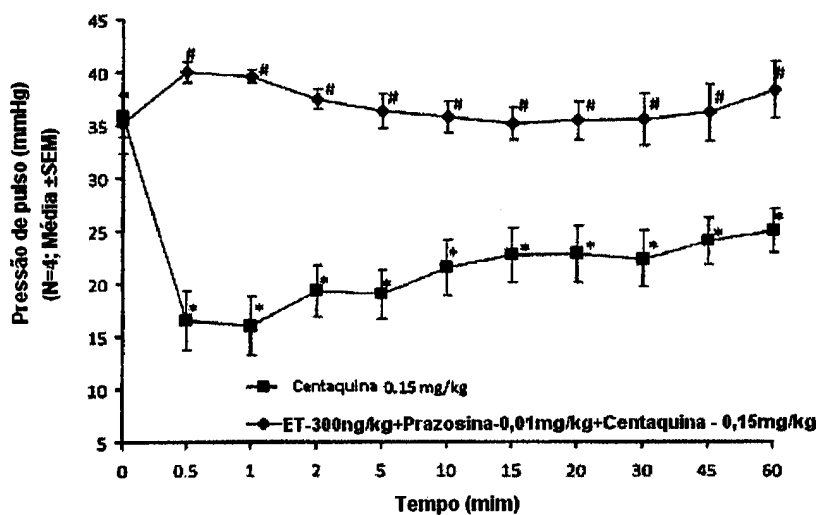


Figura 8B

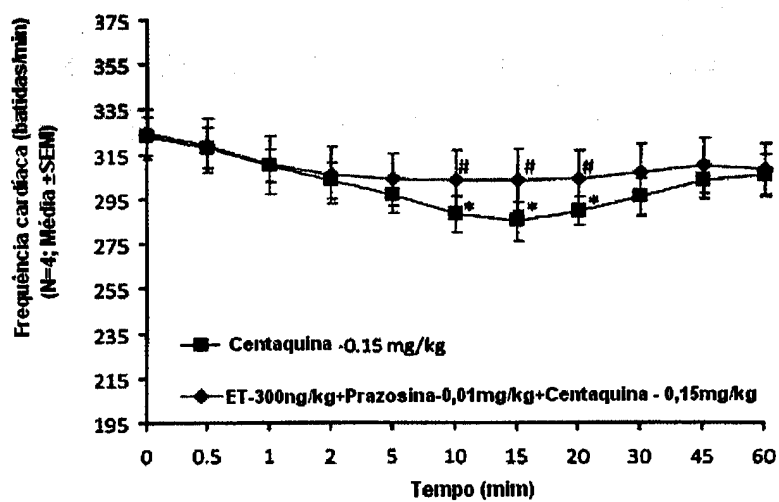


Figura 8C



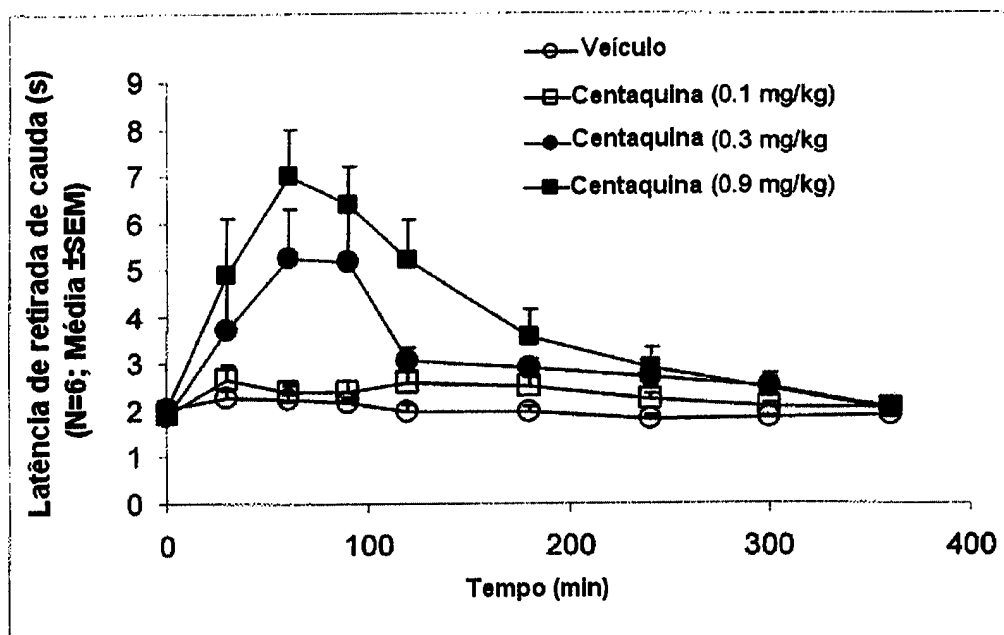


Figura 9

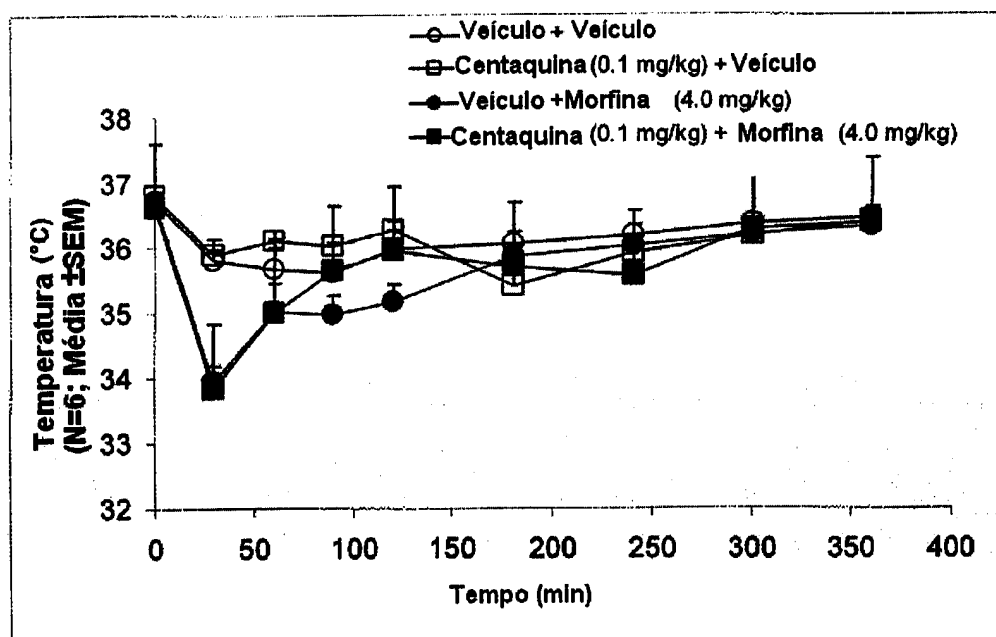


Figura 10

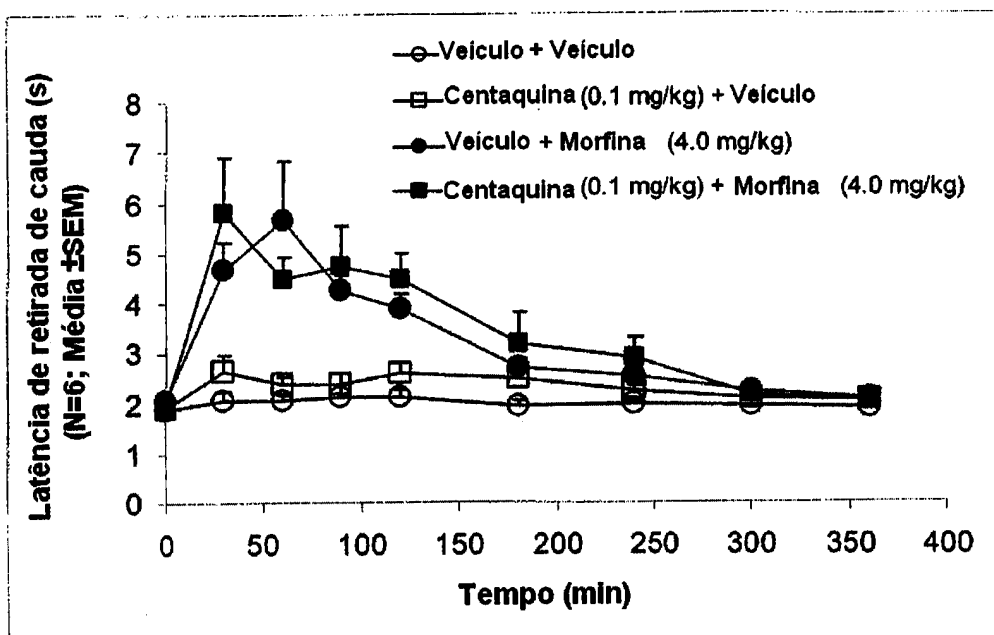


Figura 11

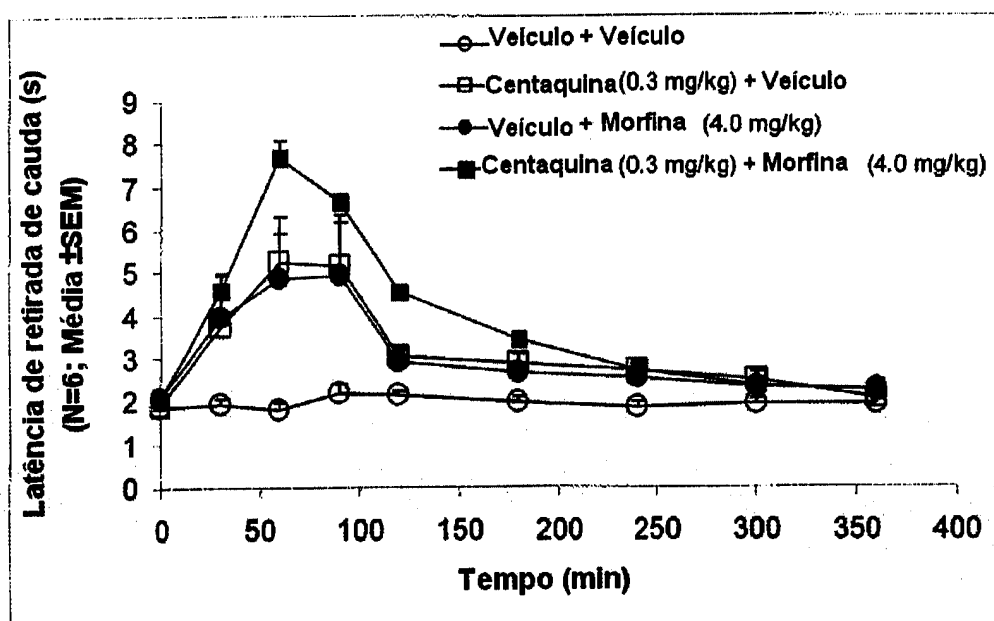


Figura 12

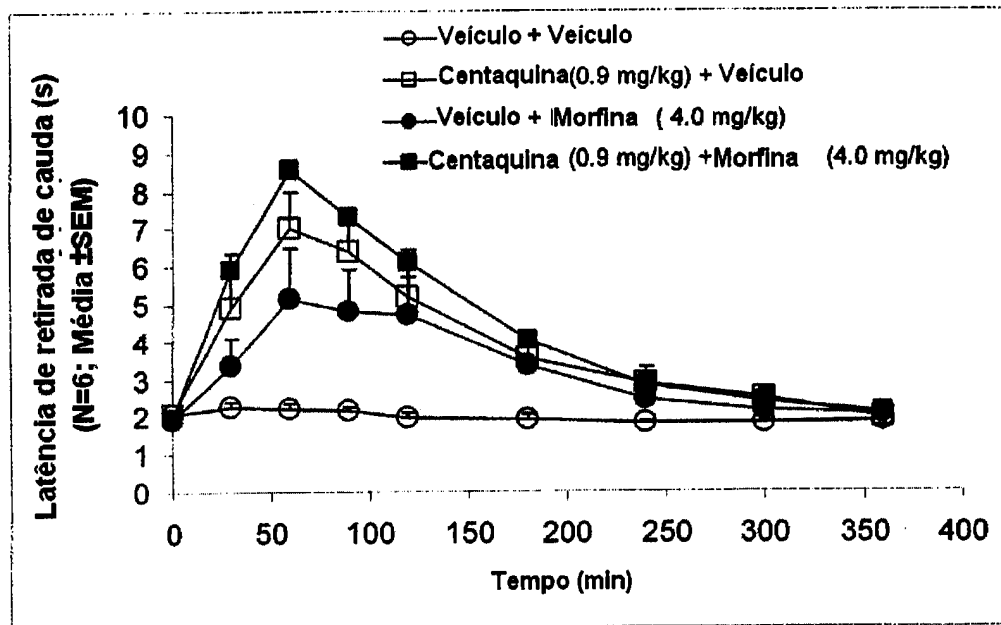


Figura 13

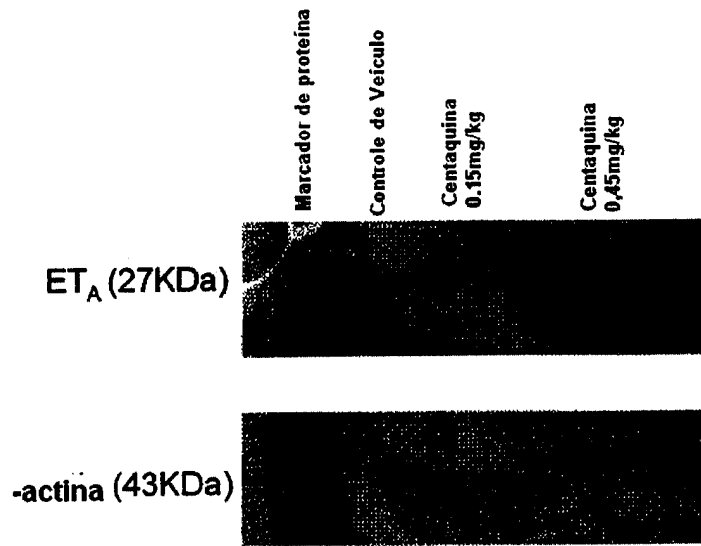


Figura 14A

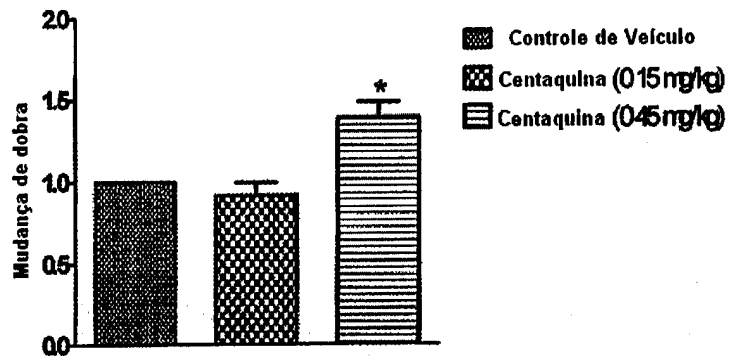
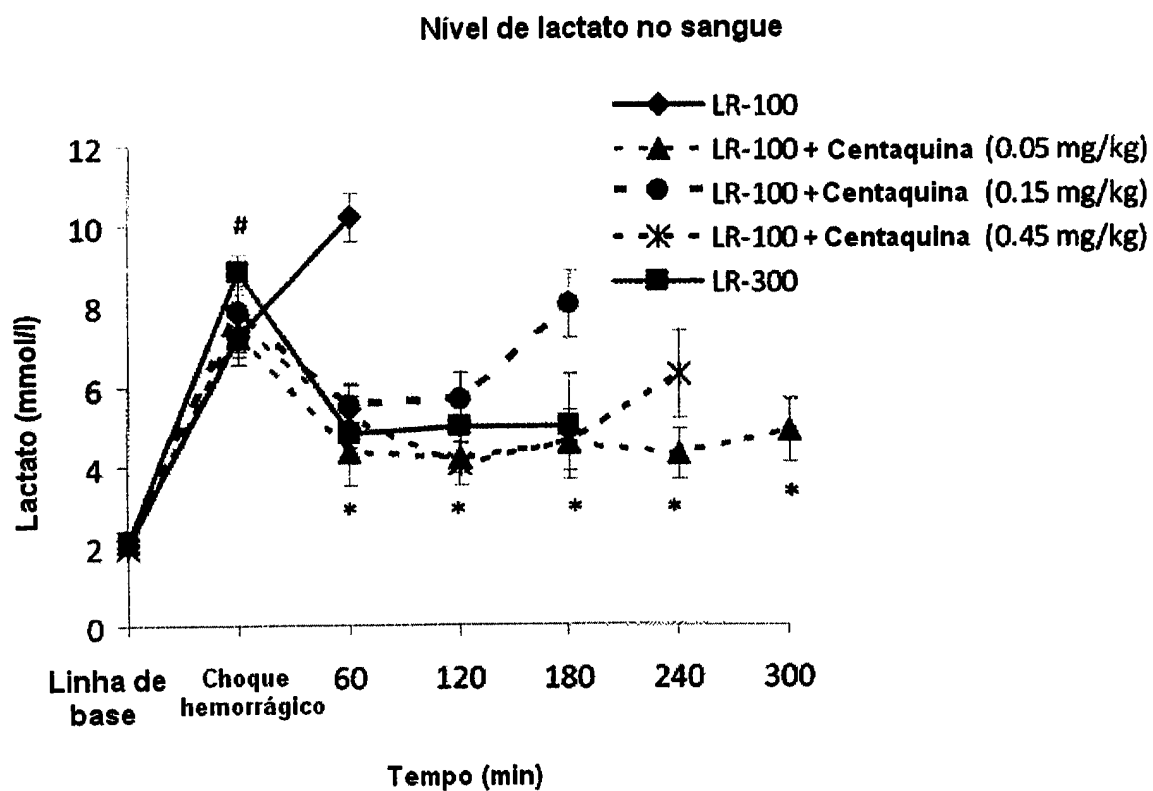


Figura 14B

**Figura 15**

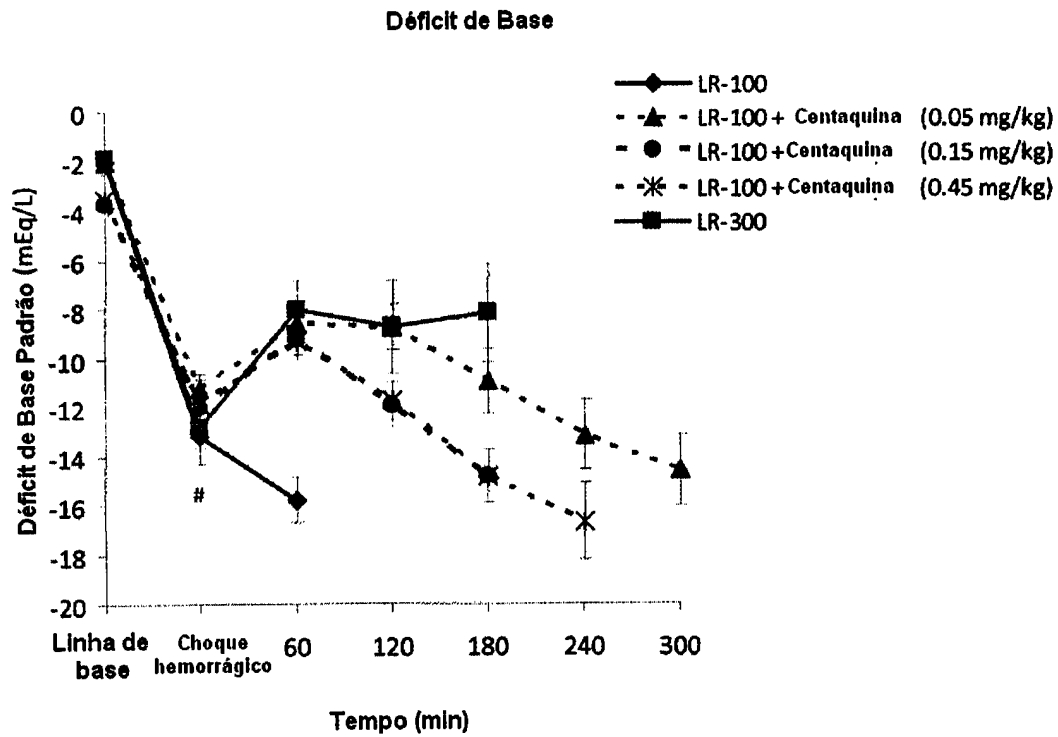


Figura 16

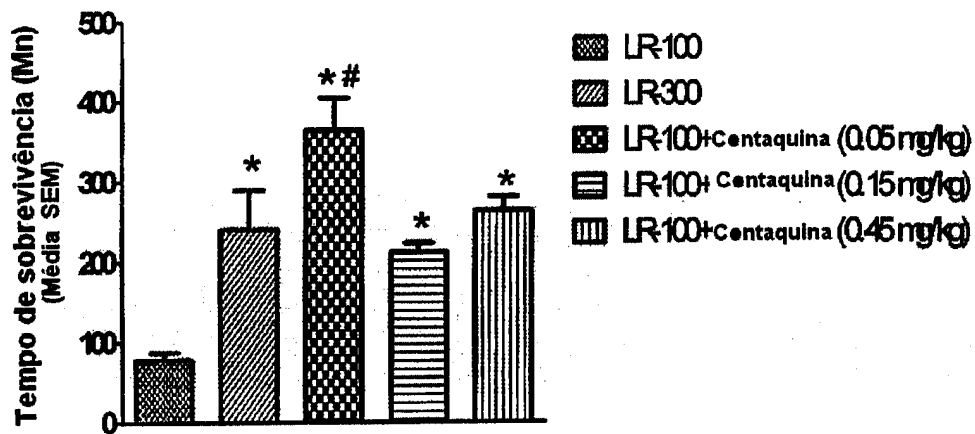
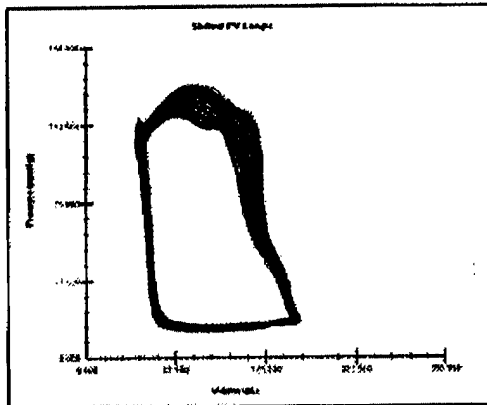
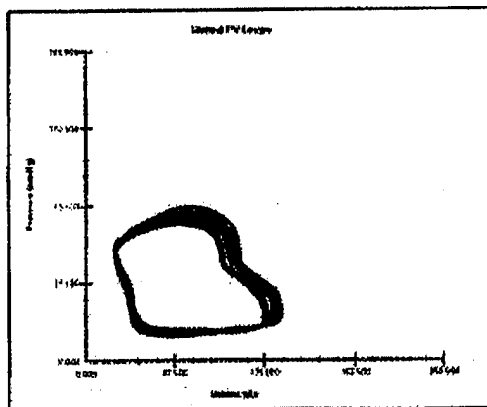
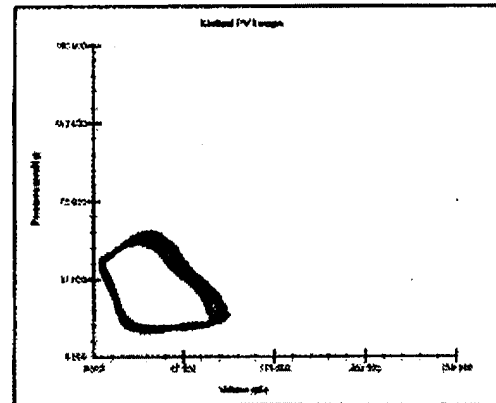
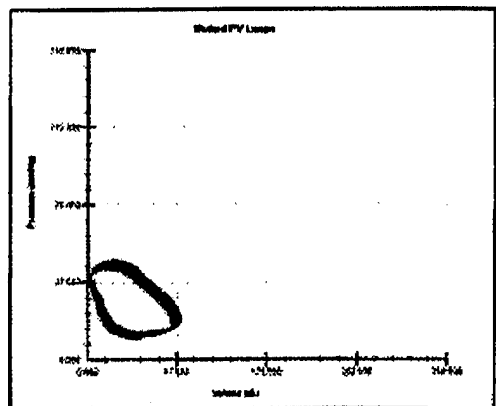


Figura 17

**Linha de base****Fig. 18A****30 min após ressuscitação****Fig. 18C****Choque hemorrágico****Fig. 18B****60 min após ressuscitação****Fig. 18D**

1h após ressuscitação

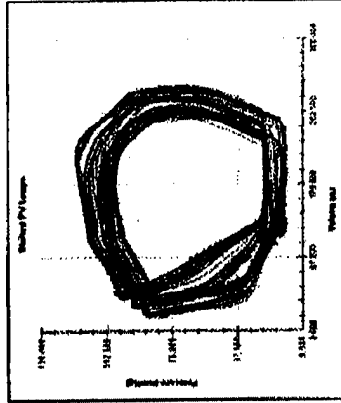


Fig. 19C

Choque hemorrágico

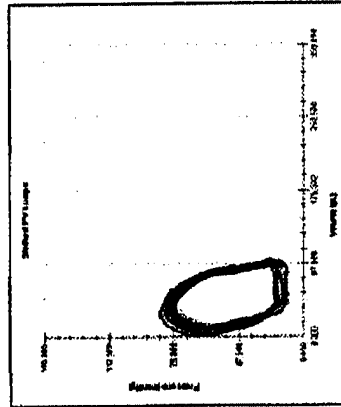


Fig. 19B

Linha de base

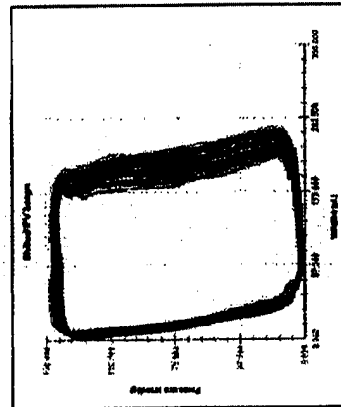


Fig. 19A

3h após ressuscitação

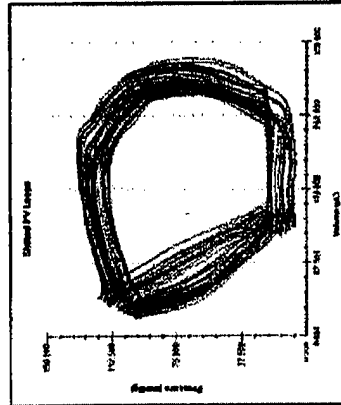


Fig. 19E

2h após ressuscitação

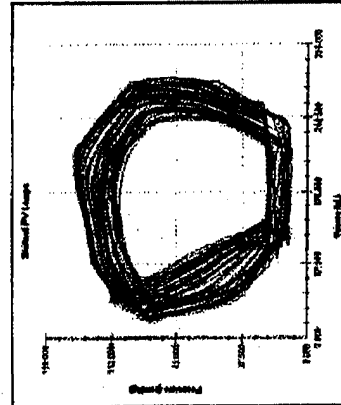


Fig. 19D



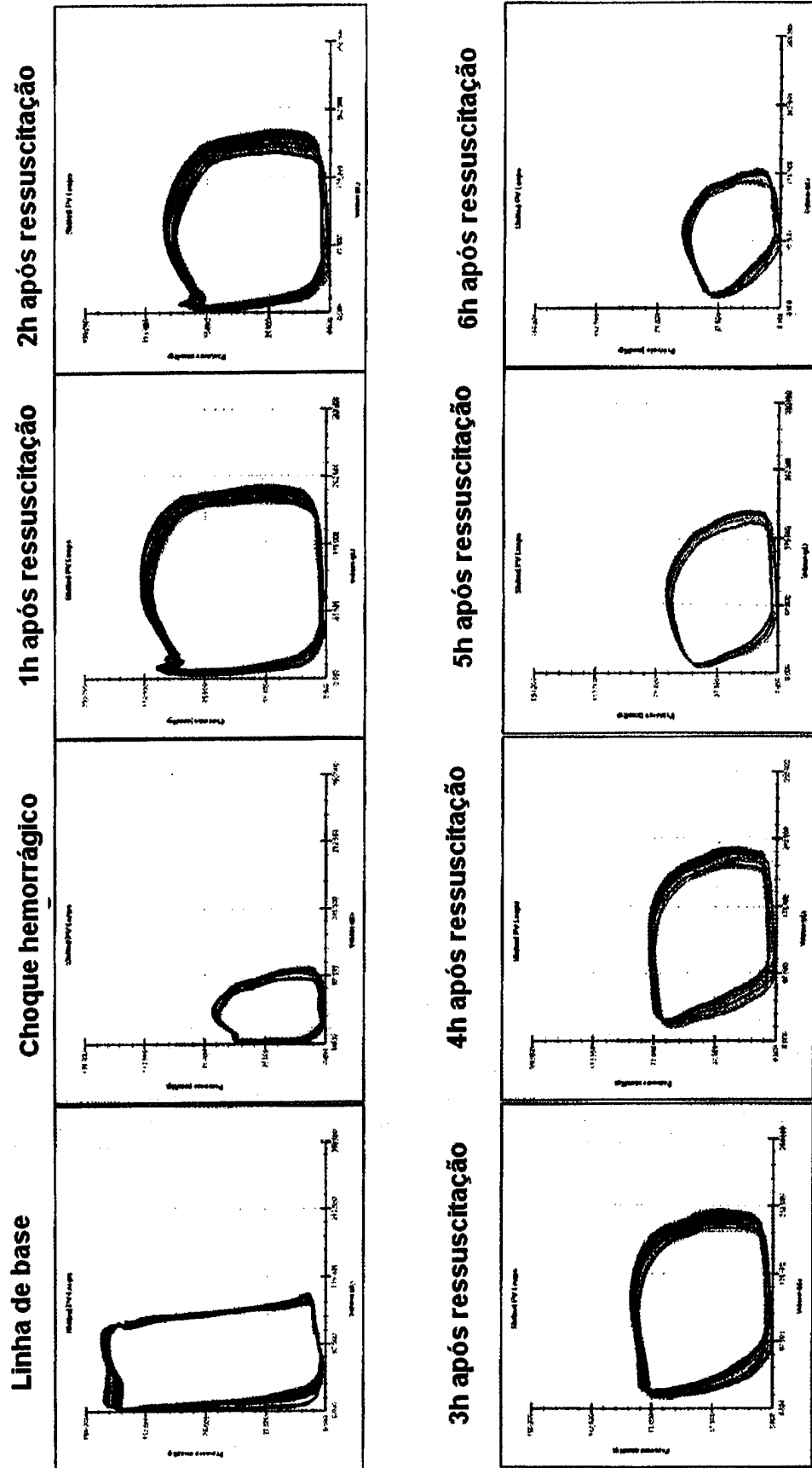


Figura 20