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

(21) BR 112020022395-6 A2

(22) Data do Depósito: 03/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: ALTERAÇÕES EM RECEPTORES DE ENDOTELINA EM SEGUIDA A HEMORRAGIA E RESSUSCITAÇÃO POR CENTAQUINA

(51) Int. Cl.: A61P 9/00; A61P 13/12; A61P 25/00; A61P 35/00; A61P 43/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/05/2018 US 62/666,675; 25/05/2018 IN 201841019588.

(71) Depositante(es): MIDWESTERN UNIVERSITY; PHARMAZZ, INC..

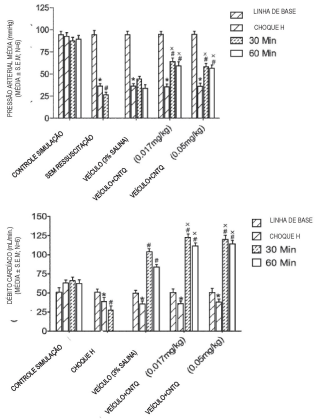
(72) Inventor(es): ANIL GULATI; MANISH LAVHALE; BHAWNA KATIA; ABHISHEK KUMAR SINGH.

(86) Pedido PCT: PCT US2019030652 de 03/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/213558 de 07/11/2019

(85) Data da Fase Nacional: 03/11/2020

(57) Resumo: ALTERAÇÕES EM RECEPTORES DE ENDOTELINA EM SEGUIDA A HEMORRAGIA E RESSUSCITAÇÃO POR CENTAQUINA. A presente divulgação se refere a métodos e composições para tratar ou prevenir lesão ou insuficiência renal compreendendo administrar um agonista do receptor de endotelina B (ETB) e/ou um agente adrenérgico (alfa)2.



ALTERAÇÕES EM RECEPTORES DE ENDOTELINA EM SEGUIDA A HEMORRAGIA E RESSUSCITAÇÃO POR CENTAQUINA

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade de acordo com 35 U.S.C. § 119(e) do Pedido de Patente Provisório US 62/666.675, depositado em 3 de maio de 2018, e do Pedido Indiano Nº 201841019588, depositado em 25 de maio de 2018, cujas divulgações são incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente divulgação se refere a métodos e composições para tratar ou prevenir lesão ou insuficiência renal compreendendo administrar um agonista do receptor de endotelina B (ET_B) e/ou um agente adrenérgico α_2.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DE MATERIAIS APRESENTADOS ELETRONICAMENTE

[0003] Este pedido contém, como uma parte separada da divulgação, uma Listagem de Sequências em formato legível por computador (Nome de arquivo: 50000A_Seqlisting.txt; Tamanho: 673 bytes; Criado em 2 de maio de 2019), que é incorporado por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES

[0004] Choque hemorrágico frequentemente leva à múltipla falência de órgãos devido à circulação sanguínea inadequada, perfusão e oxigenação como resultado de perda de sangue rápida e excessiva (Wu *et al.* 2009). Múltiplos mecanismos compensatórios para preservar oxigenação e fluxo sanguíneo em tecido são iniciados com o início da hemorragia. Apesar da ressuscitação com fluidos intravenosos para restaurar circulação e fornecimento de oxigênio, pacientes ainda podem sofrer perda irreversível de perfusão sanguínea, coagulopatia, hipotermia, acidose, supressão imune, inflamação sistêmica, tensão oxidativa, múltipla falência de órgãos e morte (Acosta *et al.* 1998; Jacob e Kumar 2014). Mortes dechoque hemorrágico

tipicamente ocorre muito cedo, principalmente dentro das primeiras 6 horas de admissão(Shackford *et al.* 1993).

[0005] Endotelina (ET), um peptídeo endógeno de 21 aminoácidos, foi isolado pela primeira vez de células endoteliais aórticas porcinas há quase 3 décadas atrás (Yanagisawa *et al.* 1988). Existem 3 isopeptídeos distintos: ET-1, ET-2 e ET-3, que estão presentes em vários tecidos de mamíferos, desempenhando uma miríade de papéis fisiológicos e patológicos, tal como regulação da pressão sanguínea e perfusão, apoptose e proliferação e migração celular(Ehrenreich *et al.* 2000; Inoue *et al.* 1989; Vidovic *et al.* 2008; Yanagisawa *et al.* 1988). Os peptídeos ET produzem seus efeitos biológicos por ativação de receptores acoplados à proteína G: ET_A e ET_B (Arai *et al.* 1990). No entanto, ET-1 e seus receptores não se limitam ao sistema vascular.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Em alguns aspectos, a presente divulgação é dirigida a uso do agonista do receptor ET_B, IRL-1620, e um agente adrenérgico, centaquina, no tratamento de insuficiência renal aguda. Em particular, foi descoberto inesperadamente que a superexpressão ou estimulação de receptores ET_B aumenta significativamente a perfusão sanguínea renal.

[0007] Em outros aspectos, a divulgação é dirigida à administração de um agonista específico para receptores ET_B sozinho ou em combinação com centaquina a um indivíduo em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a administração de um agonista do receptor de ET_B sozinho ou em combinação com centaquina previne ou trata a lesão renal aguda.

[0008] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para prevenir ou tratar lesão ou insuficiência renal administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agonista do receptor de endotelina B (ET_B) a um indivíduo em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, o agonista do receptor de ET_B é selecionado do grupo que consiste em N-Succinil-[Glu^{9}, $Ala^{11,15}$] endotelina 1 (IRL-1620), BQ-3020, [$Ala^{1,3,\ 11,15}$]-endotelina, sarafotoxina S6c e endotelina 3. Em modalidades adicionais, o

agonista do receptor de ET_B é administrado em uma dose variando de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg. Em algumas modalidades, o método compreende administrar doses múltiplas do agonista do receptor de ET_B. Em ainda modalidades adicionais, a administração compreende uma dose única do agonista do receptor de ET_B. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou um sal do mesmo ao indivíduo.

[0009] Em algumas modalidades, a lesão ou insuficiência renal é aguda. Em modalidades adicionais, a insuficiência renal resulta de exposição a meios de radiocontraste, uma droga anti-inflamatório não esteroidal (NSAID), um antibiótico, um agente quimioterapêutiico, nefrite tubulointersticial granulomatosa aguda induzida por nivolumabe ou um droga nefrotóxica. Em algumas modalidades, a insuficiência renal aguda é causada por ou está associada a doença crítica, débito cardíaco reduzido, trauma, oxigenação sanguínea reduzida, toxicidade sistêmica causada por reação a lesão em outro órgão, hipotensão sistêmica resultante de síndrome cardiorrenal, cirurgia cardíaca ou insuficiência cardíaca descompensada aguda, uma redução no volume circulante devido a hemorragia, choque séptico, choque hipovolêmico, dengue severa, um procedimento cirúrgico, rabdomiólise ou uma redução em fluxo sanguíneo renal local resultante de síndrome hepatorrenal ou transplante de fígado, ou desidratação causada por diarreia, vômito, diuréticos ou sudorese excessiva.

[0010] Em algumas modalidades, a taxa de filtração glomerular renal do indivíduo é melhorada. Em algumas modalidades, o nível de creatinina sérica do indivíduo é reduzido.

[0011] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma composição compreendendo (a) um agonista do receptor de endotelina B (ET_B), (b) centaquina ou um sal do mesmo e, opcionalmente, (c) um excipiente.

[0012] Em outros aspectos, a divulgação fornece um artigo de fabricação compreendendo: (a) uma composição empacotada compreendendo um

agonista do receptor de endotelina-B (ET_B) e centaquina ou um sal do mesmo; (b) um folheto fornecendo instruções para uma administração simultânea ou sequencial do agonista do receptor de ET_B e da centaquina ou sal da mesma para tratar um paciente; e (c) um recipiente para (a) e (b). Em algumas modalidades, o agonista do receptor de endotelina-B (ET_B) é N-Succinil-[Glu^9, $Ala^{11,15}$] endotelina 1 (IRL-1620).

[0013] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para tratar um indivíduo sofrendo de declínio da função renal agudo compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo centaquina ou um sal da mesma. Em algumas modalidades, o declínio da função renal agudo está associado à insuficiência renal aguda. Em algumas modalidades, as causas do declínio agudo nas funções renais são pré-renais devido à diminuição do fluxo sanguíneo para o rim, intrínseca onde os tecidos dentro dos rins são diretamente danificados e pós-renal, onde o fluxo de urina é bloqueado. Em algumas modalidades, a insuficiência renal aguda é causada por ou está associada a doença crítica, débito cardíaco reduzido, trauma, oxigenação sanguínea reduzida, toxicidade sistêmica causada por reação a lesão em outro órgão, hipotensão sistêmica resultante de síndrome cardiorrenal, cirurgia cardíaca ou insuficiência cardíaca descompensada aguda, uma redução no volume circulante devido a hemorragia, choque séptico, choque hipovolêmico, dengue severa, um procedimento cirúrgico, rabdomiólise ou uma redução em fluxo sanguíneo renal local resultante de síndrome hepatorrenal ou transplante de fígado, nefrotoxicidade resultante de drogas, meio de radiocontraste, uma droga anti-inflamatória não esteroidal (NSAID), um antibiótico, ou um agente quimioterapêutico, ou desidratação causada por diarreia, vômito, diuréticos ou sudorese excessiva.

[0014] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para tratar um indivíduo sofrendo de lesão renal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo

centaquina ou um sal do mesmo. Em algumas modalidades, a lesão renal resulta de um evento isquêmico ou um evento de reperfusão isquêmica. Em modalidades adicionais, o sal é citrato, piruvato ou lactato. Em algumas modalidades, a centaquina ou sal da mesma é administrada a uma dose de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg. Em modalidades adicionais, centaquina ou sal da mesma é administrado em doses únicas ou múltiplas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0015] **Figura 1** mostra o efeito da hemorragia na pressão arterial média, frequência cardíaca, débito cardíaco e resistência vascular sistêmica em ratos sham e hemorragidos. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com salina hipertônica ou centaquina. Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=5). *p<0,05 em comparação com a linha de base, $^{\#}$p<0,05 em comparação com hemorragia, ^{x}p<0,05 em comparação com o grupo tratado com veículo.

[0016] **Figura 2** representa o efeito da hemorragia na expressão dos receptores ET_A em ratos sham e hemorragidos. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com salina hipertônica ou centaquina. Pista 1- Simulação; Pista 2 - Choque hemorrágico; Pista 3 - Salina hipertônica (veículo); Pista 4 - Veículo + centaquina (0,017 mg/kg); Pista 5 - Veículo + centaquina (0,05 mg/kg). Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=4). *p<0,05 em comparação com simulação, $^{\#}$p<0,05 em comparação com hemorragia ou salina hipertônica.

[0017] **Figura 3** mostra o efeito da hemorragia na expressão de receptores de ET_B em ratos de simulação e hemorragidos. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com salina hipertônica ou centaquina. Pista 1- Simulação; Pista 2 - Choque hemorrágico; Pista 3 - Salina hipertônica (veículo); Pista 4 - Veículo + centaquina (0,017 mg/kg); Pista 5 - Veículo + centaquina (0,05 mg/kg). Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=4). *p<0,05 em comparação com simulação, $^{\#}$p<0,05 em comparação com hemorragia ou salina hipertônica.

[0018] **Figura 4** mostra o efeito da hemorragia no plasma TNF-α, IL-6 e IL-10 em ratos de simulação e com hemorragia. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com salina hipertônica ou centaquina. Os valores são expressos

como média ± S.E.M. (n=5). *p<0,05 em comparação com simulação, #p<0,05 em comparação com hemorragia, @p<0,05 em comparação com salina hipertônica.

[0019] **Figura 5** mostra o efeito da hemorragia em perfusão sanguínea renal em ratos machos com perda de sangue massiva. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com veículo (salina) ou centaquina em dose baixa (0,01 mg/kg) ou dose alta (0,1 mg/kg). Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=5). *p<0,05 em comparação com hemorragia, #p<0,05 em comparação com veículo (salina).

[0020] **Figura 6** mostra o efeito da hemorragia em perfusão sanguínea renal em ratos fêmeas com perda de sangue massiva. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com veículo (salina) ou centaquina em dose baixa (0,01 mg/kg) ou dose alta (0,1 mg/kg). Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=5). *p<0,05 em comparação com hemorragia, #p<0,05 em comparação com veículo (salina).

[0021] **Figura 7** mostra resultados de experimentos nos quais ratos machos foram anestesiados com uretano, a veia femoral foi canulada para administração de droga, a artéria femoral foi canulada para medir pressão arterial média (PAM) e uma sonda de fluxo Doppler a laser foi colocada na medula renal para medir perfusão sanguínea. Indução de choque hemorrágico foi iniciada pela retirada de sangue para manter a MAP em 35 mmHg por 30 minutos. Infusão de norepinefrina foi realizada para trazer e manter a MAP em 70 mmHg. O efeito de centaquina em funções cardiovasculares foi medido antes da indução de choque, 30 minutos após choque (hemorragia) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após ressuscitação. Centaquina melhorou perfusão sanguínea renal de ratos machos hemorragidos em comparação com controle de veículo em seguida a ressuscitação. Os efeitos adversos de vasoconstrição induzida por norepinefrina podem ser atenuados por centaquina.

[0022] **Figura 8** mostra resultados de experimentos nos quais ratos fêmeas foram anestesiados com uretano, a veia femoral foi canulada para

administração de droga, a artéria femoral foi canulada para medir pressão arterial média (MAP) e uma sonda de fluxo Doppler a laser foi colocada na medula renal para medir a perfusão sanguínea. Indução de choque hemorrágico foi iniciada pela retirada de sangue para manter a MAP em 35 mmHg por 30 minutos. Infusão de norepinefrina foi realizada para trazer e manter a MAP em 70 mmHg. O efeito de centaquina em funções cardiovasculares foi medido antes da indução de choque, 30 minutos após choque (hemorragia) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após ressuscitação. Centaquina melhorou perfusão sanguínea renal de ratos fêmeas hemorragidos em comparação com controle de veículo em seguida a ressuscitação e uma perfusão sanguínea melhorada foi observada até o final do experimento. Os efeitos adversos de vasoconstrição induzida por norepinefrina podem ser atenuados por centaquina.

[0023] **Figura 9** mostra resultados do estudo de fase II de centaquina como um agente ressuscitador para choque hipovolêmico devido à perda excessiva de sangue no qual pressão arterial sistólica e diastólica foi determinada quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta de hospital (fim do estudo). Uma análise nesse interim mostrou que aumento da pressão arterial em pacientes tratados com centaquina foi maior do que observado na coorte de controle. Esses resultados indicaram que centaquina é um agente ressuscitador eficaz e melhorou o resultado de pacientes de choque hipovolêmico.

[0024] **Figura 10** mostra resultados do estudo de fase II de centaquina como um agente ressuscitador para choque hipovolêmico devido à perda excessiva de sangue no qual todos os sujeitos receberam padrão de cuidados juntamente com tratamento de choque padrão. Pacientes foram, então, designados aleatoriamente para qualquer de uma coorte de controle que recebeu tratamento padrão junto com salina normal ou uma coorte de centaquina que recebeu tratamento padrão com centaquina. Níveis de creatinina sérica foram determinados quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no

tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse interim de acordo com o protocolo aprovado mostrou que o nível de creatinina sérica diminuiu em 25,35% em coorte de controle e em 42,61% em pacientes tratados com centaquina. Os dados indicaram que a redução de níveis de creatinina sérica por centaquina é de 17,26% mais em comparação com o tratamento padrão.

[0025] **Figura 11** mostra resultados do estudo de fase II de centaquina como um agente ressuscitador para choque hipovolêmico devido à perda excessiva de sangue no qual todos os sujeitos receberam padrão de cuidados juntamente com tratamento de choque padrão. Pacientes foram, então, designados aleatoriamente para qualquer de uma coorte de controle que recebeu tratamento padrão junto com salina normal ou uma coorte de centaquina que recebeu tratamento padrão com centaquina. Nitrogênio de ureia no sangue foi determinado quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse interim conforme protocolo aprovado mostrou que o nitrogênio de uréia no sangue foi semelhante em coorte de controle e em pacientes tratados com centaquina.

[0026] **Figura 12** mostra resultados do estudo de fase II de centaquina como um agente ressuscitador para choque hipovolêmico devido à perda excessiva de sangue no qual todos os sujeitos receberam padrão de cuidados juntamente com tratamento de choque padrão. Pacientes foram, então, designados aleatoriamente para qualquer de uma coorte de controle que recebeu tratamento padrão junto com salina normal ou uma coorte de centaquina que recebeu tratamento padrão com centaquina. Taxa de filtração flomerular foi determinada quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse interim de acordo com o protocolo aprovado mostrou que a taxa de filtração glomerular aumentou em 40,00% em coorte de controle e em 81,52% em pacientes tratados com centaquina. Os dados indicaram que um aumento em taxa de

filtração glomerular por centaquina é de 41,52% mais em comparação com tratamento padrão.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0027] Foi estabelecido que doses baixas de centaquina (2-[2-(4-(3-metifenil)-1-piperazinil)]etil-quinolina)citrato, diminuíram significativamente lactato no sangue e aumentaram a pressão arterial média (MAP), pressão do pulso (PP) e débito cardíaco (CO) em choque hemorrágico (Gulati *et al.* 2012; Gulati *et al.* 2013; Lavhale *et al.* 2013; Papapanagiotou *et al.* 2016). Estudos comparativos (ver Exemplo 2) foram realizados entre centaquina e agentes de ressuscitação status quo agrupados em 3 categorias diferentes: (a) fluidos, tal como Ringer Lactado, salina hipertônica; (b) agentes adrenérgicos, talcomo norepinefrina e (c) sangue fresco. Resultados usando (i) um modelo de rato de perda de sangue de pressão fixa, (ii) um modelo de coelho de sangramento descontrolado com trauma e (iii) um modelo de porco de perda massiva de sangue indicam que centaquina é altamente eficaz em reduzir a mortalidade em seguida a choque hipovolêmico (Gulati *et al.* 2012; Gulati *et al.* 2013; Lavhale *et al.* 2013; Papapanagiotou *et al.* 2016). Ao contrário de outros agentes ressuscitadores (vasopressores), centaquina aumentou MAP aumentando o volume sistólico (SV) e CO; e frequência cardíaca e resistência vascular sistêmica (RVS) diminuídas.

[0028] Níveis plasmáticos elevados de ET-1 durante choque hemorrágico, juntamente com uma diminuição em fluxo sanguíneo para os rins e os pulmões, foram relatados anteriormente (Chang *et al.* 1993; Edwards *et al.* 1994). Uma diminuição em fluxo sanguíneo pulmonar e renal em seguida a choque hemorrágico, causando depuração reduzida de ET-1, pode ser responsável por um aumento em ET-1 plasmática circulante que desempenha um papel importante na manutenção do tônus vascular e da perfusão sanguínea de tecido (Chang *et al.* 1993). ET-1 circulante pode regular o sistema cardiovascular em seguida a choque hemorrágico agindo em receptores de ET_A, como vasoconstritor e em receptores ET_B, como um vasodilatador para

manter tônus vascular (Bourque *et al.* 2011; Cardillo *et al.* 2000; Helmy *et al.* 2001; Sandoo *et al.* 2010).

[0029] Centaquina está atualmente em desenvolvimento clínico como um agente de ressuscitação para choquehemorrágico. Sem desejar ser limitado por teoria, o mecanismo proposto é que centaquina age em receptores adrenérgicos α_{2B} venosos para produzir constrição e aumentar retorno venoso ao coração e estimular receptores adrenérgicos α_{2A} centrais a produzir uma diminuição em SVR. No entanto, receptores adrenérgicos demonstraram ser modulados por receptores de endotelina (ET) (Gulati 1992; Gulati and Srimal 1993; Lavhale *et al.* 2010; Sanchez *et al.* 2014), portanto, é possível que receptores de ET possam estar envolvidos no mecanismo de ação de centaquina em choque hemorrágico.

Lesão/Insuficiência Renal

[0030] Insuficiência renal aguda é a perda repentina da capacidade dos rins de filtrar resíduos sem perder eletrólitos. Na maioria das vezes, a insuficiência renal aguda (também chamada de lesão renal aguda ou AKI) é causada por fluxo sanguíneo reduzido para os rins (insuficiência renal aguda pré-renal), embora cerca de 20% dos casos sejam devidos a infecções ou toxinas afetando os rins diretamente (ARF intrínseca) e cerca de 10% são devidos a bloqueios a jusante dos rins (obstrução pós-renal). A lesão renal aguda (AKI) tem alta prevalência em pacientes em terapia intensiva. Detecção precoce pode evitar que pacientes desenvolvam doença renal crônica e necessidade de terapia substitutiva renal. Na maioria dos pacientes hospitalizados, insuficiência renal aguda é causada por necrose tubular aguda, o que resulta de agressões isquêmicas e/ou nefrotóxicas. Hipoperfusão renal é causada por choque hipovolêmico, cardiogênico e séptico, por administração de drogas vasoconstritoras ou lesão renovascular. Nefrotoxinas incluem toxinas exógenas, tal como meios de contraste e aminoglicosídeos, bem como toxinas endógenas, tal como mioglobina. Estudos indicam que apoptose em tecido renal é proeminente na maioria dos casos humanos de insuficiência renal

aguda, com o principal sítio de morte celular apoptótica sendo o néfron distal. Durante a fase inicial da lesão isquêmica, perda de integridade do citoesqueleto de actina leva a achatamento do epitélio, com perda da borda em escova, perda de contatos de células focais e subsequente desprendimento da célula do substrato subjacente. Foi sugerido que morte celular de túbulo apoptótica pode ser mais preditiva de mudanças funcionais do que morte celular necrótica (Komarov et al. 1999; Supavekin et al. 2003). Um indivíduo em risco de desenvolver insuficiência renal aguda isquêmica inclui indivíduos com diabetes, insuficiência renal subjacente, síndrome nefrítica, idosos, doença aterosclerótica, receptores de agente nefrotóxico, sepse, indivíduos hipotensos, indivíduos hipóxicos, pré-cirurgia, mioglobinúria-hematúria, insuficiência renal aguda associada a gravide e doença do fígado.

[0031] A lesão renal aguda é caracterizada por pelo menos uma condição selecionada do grupo consistindo em um aumento em creatinina sérica em pelo menos 50% acima da linha de base, um aumento absoluto em creatinina sérica de pelo menos 0,3 mg/dL acima da linha de base, uma redução em taxa de filtração glomerular de pelo menos 25% em comparação com a linha de base e uma diminuição da produção de urina para 0,5 ml por quilograma de peso corporal ou menos por hora, persistindo por pelo menos 6 horas.

[0032] A incidência de insuficiência renal aguda (ARF) adquirida na comunidade é de apenas cerca de 100 casos por milhão de habitantes, com uma taxa de mortalidade de 7%. A incidência publicada de ARF varia de 1 a 13% de todas as internações hospitalares (34×10^6/ano nos EUA) e 20 a 30% de todas as inernações em ICU ($4{,}4\times10^6$/ano nos EUA). A maioria dos casos de ARF é adquirida no hospital como resultado de complicações de outras doenças ou intervenções. As causas mais comuns são sepse, hipovolemia, cirurgia, agentes de contraste de imagem, drogas de quimioterapia, NSAIDs e alguns antibióticos.

[0033] Uma lesão renal aguda pode envolver uma lesão renal pré-renal causada por ou associada a um débito cardíaco reduzido levando a fluxo

sanguíneo geral reduzido para os rins, trauma, oxigenação sanguínea reduzida, toxicidade sistêmica causada por reação a lesão em outro órgão, hipotensão sistêmica resultante de síndrome cardiorrenal ou insuficiência cardíaca descompensada aguda, uma redução do volume circulante devido a hemorragia, um procedimento cirúrgico ou uma redução de fluxo sanguíneo renal local resultante da síndrome hepatorrenal.

[0034] Em um estudo, lesão renal aguda se desenvolveu em 52,6% (n = 8.270) de toda a coorte e em 39,8% do grupo de idade adulta jovem (16-25 anos). Para o grupo de idade adulta jovem, diabetes, razão cirúrgica para internação, severidade da doença, hipotensão e certos medicamentos (vancomicina e inibidores da calcineurina) foram todos independentemente associados à lesão renal aguda. A lesão renal aguda foi um preditor significativo para maior tempo de internação, mortalidade na unidade de terapia intensiva e mortalidade após alta. Portanto, lesão renal aguda é um evento comum e está associada a um aumento do tempo de internação e a um alto risco de mortalidade (Fuhrman et al. 2018).

[0035] Usando a 2001 National Hospital Discharge Survey, Liangos et al. (2006) descobriram que 1,9% de todas as altas hospitalares apresentaram um código para ARF, o que corresponde a uma incidência nos EUA de 646.000. A taxa de mortalidade foi de 21,3%. Os autores validaram o estudo examinando todos os 13.237 pacientes que receberam alta do St. Elizabeth's (Boston) durante 2001. Observou-se que 2,6% dos pacientes foram codificados para ARF, mas valores laboratoriais mostraram que 12% dos pacientes haviam experimentado ARF. Assim, a ARF é codificada em apenas cerca de 20% de ocorrências (presumivelmente os casos mais sérios) (Liangos et al. 2006).

[0036] O tratamento da insuficiência renal aguda é para dar fluidos para reverter hipovolemia e lavar toxinas enquanto esperando que os rins se recuperem. Em alguns casos, os pacientes retêm água demais ou seu equilíbrio eletrolítico sofre a tal ponto que eles precisam de diálise. As causas mais comuns de morte em pacientes de insuficiência renal aguda são

insuficiência cardíaca, sepse e insuficiência respiratória. Pacientes que se recuperam de insuficiência renal aguda apresentam elevada probabilidade de morte e doença renal crônica através dos 5 e 10 anos seguintes. Dezenas de novos tratamentos e drogas que demonstraram ser promissores em animais foram testados clinicamente em pacientes de insuficiência renal aguda, mas nenhum demonstrou benefícios em experimentos clínicos randomizados. Alguns dos tratamentos testados incluem diuréticos para aumentar fluxo de urina, dopamina e peptídeo natriurético atrial (ANP) para aumentar fluxo sanguíneo para os rins, muitos agentes citoprotetores para preservar células epiteliais dos túbulos, tal como sequestrantes de radicais livres, proteínas de choque térmico, hemeoxigenase, inibidores da xantina oxidase, prostaglandinas e bloqueadores do canal de cálcio e vários fatores de crescimento para acelerar a recuperação dos túbulos proximais (Allgren et al. 1997; Hirschberg et al. 1999).

[0037] Lesão renal aguda foi relatada após cirurgia cardíaca; transplante de fígado; dengue severa; choque séptico; choque hipovolêmico; drogas nefrotóxicas, tal como contraste radiográfico intravenoso, vancomicina, piperacilina-tazobactama combinada com vancomicina, colistina, nefrite tubulointersticial granulomatosa aguda induzida por nivolumab, drogas anticâncer, lesão renal aguda induzida por cisplatina; pacientes criticamente doentes com tumores sólidos; Lesão renal aguda induzida por litíase; rabdomiólise.

[0038] Estudos foram conduzidos para determinar o efeito de centaquina em fluxo sanguíneo medular renal e os resultados mostraram que hemorragia severa produziu uma diminuição em fluxo sanguíneo medular renal e piorando perfusão renal levando a isquemia e insuficiência renal (Gulati et al. 2016a; Gulati et al. 2017). Sabe-se que a medula renal externa tem uma demanda metabólica mais alta e onde cerca de 33% do cloreto de sódio filtrado é reabsorvido pelo espesso ramo ascendente da alça de Henle (Cowley 2008).

Portanto, essa região é altamente propensa a lesão hipóxica ou isquêmica em seguida a hemorragia excessiva.

Endotelina

[0039] Endotelina (ET) é um peptídeo endógeno que age em dois receptores acoplados à proteína G distintos, ET_A e ET_B, e desempenha inúmeras funções em todo o corpo (Arai *et al.* 1990; Goto *et al.* 1989). Os níveis de ET-1 no plasma elevados durante choque hemorrágico, juntamente com uma diminuição em fluxo sanguíneo para os rins e os pulmões, foram relatados anteriormente (Chang *et al.* 1993; Edwards *et al.* 1994). Uma diminuição em fluxo sanguíneo pulmonar e renal em seguida a choque hemorrágico, causando depuração reduzida de ET-1, pode ser responsável por um aumento na ET-1 plasmática circulante que desempenha um papel importante na manutenção do tônus vascular e da perfusão sanguínea do tecido (Chang *et al.* 1993). ET-1 circulante pode regular o sistema cardiovascular em seguida a choque hemorrágico agindo nos receptores de ET_A como um vasoconstritor e nos receptores de ET_B como um vasodilatador para manter tônus vascular (Bourque *et al.* 2011; Cardillo *et al.* 2000; Helmy *et al.* 2001; Sandoo *et al.* 2010). É, portanto, de interesse investigar o efeito de choque hemorrágico e ressuscitação com centaquina em mudanças em receptores de ET_A e ET_B em vários tecidos. Além disso, sabe-se que choque hemorrágico e ressuscitação contribuem para um elevado risco de resposta inflamatória sistêmica (Chaudry *et al.* 1990) e ET-1 desempenha um papel de articulação em inflamação em seguida a sepse e choque hemorrágico (Kowalczyk *et al.* 2015).

Agonista do receptor de endotelina B (ET_B)

[0040] A divulgação contempla o uso de um agonista do receptor da endotelina B (ET_B) nas composições e nos métodos aqui divulgados. Em várias modalidades, o agonista do receptor de ET_B é selecionado do grupo consistindo em N-Succinil- [Glu^9, $Ala^{11,15}$] endotelina 1 (IRL-1620), BQ-3020, [$Ala^{1,3,11,15}$]-endotelina, sarafotoxina S6c e endotelina 3.

[0041] IRL-1620 [N-Succinil-[Glu^{9}, Ala^{11,15}] endotelina 1] é um análogo de ET-1 com sequência de aminoácido Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp (SEQ ID NO: 1), peso molecular de 1.821,9. IRL-1620 é um agonista potente e específico para os receptores de ET_B, com valores de Ki para os receptores de ET_A e ET_B de 1,9 μM e 16 pM, respectivamente, tornando-o aproximadamente 120.000 vezes mais seletivo para receptores de ET_B sobre ET_A. IRL-1620 foi usado em inúmeros estudos para determinar as ações biológicas dos receptores de ET_B nos sistemas pulmonar, hepático, renal, gastrointestinal, dermatológico e endócrino (Bauer *et al.* 2000; Fellner and Arendshorst 2007; Khan *et al.* 2006; Lawrence *et al.* 1995; Mathison and Israel 1998; Mazzoni *et al.* 1999).

[0042] De acordo com a divulgação, o agonista do receptor de ET_B (por exemplo, IRL-1620) pode ser administrado em uma dose variando de 0,0001 a 0,5 mg/kg. Em modalidades adicionais o agonista do receptor da endotelina B é administrado a uma dose variando de cerca de 0,0001 a cerca de 0,5 mg/kg, ou de cerca de 0,0001 a cerca de 0,4 mg/kg, ou de cerca de 0,0001 a cerca de 0,3 mg/kg, ou de cerca de 0,0001 a cerca de 0,2 mg/kg, ou de cerca de 0,0001 a cerca de 0,1 mg/kg, ou de cerca de 0,001 a cerca de 0,5 mg/kg, ou de cerca de 0,001 a cerca de 0,4 mg/kg, ou de cerca de 0,001 a cerca de 0,3 mg/kg, ou de cerca de 0,001 a cerca de 0,2 mg/kg, ou de cerca de 0,001 a cerca de 0,1 mg/kg, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,5 mg/kg, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,4 mg/kg, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,3 mg/kg, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,2 mg/kg, ou de cerca de 0,01 a cerca de 0,1 mg/kg, ou de cerca de 0,0005 a cerca de 0,5 mg/kg, ou de cerca de 0,0005 a cerca de 0,4 mg/kg, ou de cerca de 0,0005 a cerca de 0,3 mg/kg, ou de cerca de 0,0005 a cerca de 0,2 mg/kg, ou de cerca de 0,0005 a cerca de 0,1 mg/kg. Em modalidades adicionais, o agonista do receptor de ETB (por exemplo, IRL-1620) é administrado a uma dose de pelo menos cerca de 0,0001 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,0002 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,0005 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,001 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,002 mg/kg, ou pelo

menos cerca de 0,005 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,007 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,01 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,02 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,03 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,04 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,05 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,06 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,07 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,08 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,09 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,1 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,2 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,3 mg/kg, ou pelo menos cerca de 0,4 mg/kg. Em ainda modalidades adicionais, o agonista do receptor da ETB (por exemplo, IRL-1620) é administrado a uma dose de pelo menos cerca de 0,0001 mg/kg, ou menos de cerca de 0,0002 mg/kg, ou menos de cerca de 0,0005 mg/kg, ou menos de cerca de 0,001 mg/kg, ou menos de cerca de 0,002 mg/kg, ou menos de cerca de 0,005 mg/kg, ou menos de cerca de 0,007 mg/kg, ou menos de cerca de 0,01 mg/kg, ou menos de cerca de 0,02 mg/kg, ou menos de cerca de 0,03 mg/kg, ou menos de cerca de 0,04 mg/kg, ou menos de cerca de 0,05 mg/kg, ou menos de cerca de 0,06 mg/kg, ou menos de cerca de 0,07 mg/kg, ou menos de cerca de 0,08 mg/kg, ou menos de cerca de 0,09 mg/kg, ou menos de cerca de 0,1 mg/kg, ou menos de cerca de 0,2 mg/kg, ou menos de cerca de 0,3 mg/kg, ou menos de cerca de 0,4 mg/kg, ou menos de cerca de 0,5 mg/kg. Em algumas modalidades, o agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é administrado a uma dose de cerca de 0,1 a cerca de 0,6 µg/kg, ou cerca de 0,1 a cerca de 0,5 µg/kg, ou cerca de 0,1 a cerca de 0,4 µg/kg , ou cerca de 0,1 a cerca de 0,3 µg/kg. Em modalidades adicionais, o agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é administrado a uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1,0 µg/kg.

[0043] O agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620), em várias modalidades, é administrado a um paciente repetidamente em intervalos de 1 a 6 horas. Em algumas modalidades, o agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é administrado ao paciente a cada 1 a 5 horas, ou a cada 1 a 4 horas, ou a cada 1 a 2 horas, ou a cada hora, ou a cada 2 horas, ou a cada

3 horas, ou a cada 4 horas, ou a cada 5 horas, ou a cada 6 horas. Em modalidades adicionais, o agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é administrado ao paciente a cada dois a cinco dias, ou a cada três a cinco dias, ou a cada dois dias, ou a cada três dias, ou a cada quatro dias, ou a cada cinco dias. Em algumas modalidades, o agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é administrado uma, duas, três, quatro ou cinco vezes por dia.

Centaquina

[0044] Centaquina, um agonista do receptor alfa-2 e agente cardiovascular ativo, demonstrou produzir um efeito inotrópico positivo e elevadas contrações ventriculares do coração de coelho perfundido isolado (Bhatnagar *et al.* 1985). O efeito inotrópico positivo direto ou indireto da centaquina pode levar a uma elevação em débito cardíaco (CO). Em estudo conduzido em um modelo suíno de choque hemorrágico verificou-se que centaquina (0,015 mg/kg), quando administrada na fase de ressuscitação de fluido, aumenta CO, reduz resistência vascular sistêmica (SVR), requer menor volume de fluidos para ressuscitação e resulta em sobrevivência significativamente melhor em comparação com Ringer's Lactada (LR)(Papalexopoulou *et al.* 2017; Papapanagiotou *et al.* 2016). Em outro estudo, centaquina administrada em um quinto do volume de perda de sangue manteve pressão arterial média (MAP) de ratos hemorragidos por mais tempo e melhorou a sobrevivência (Gulati *et al.* 2013). Em um modelo de rato de choque hemorrágico, centaquina melhorou significativamente o CO, diminuiu lactato sanguíneo e melhorou sobrevivência (Gulati *et al.* 2012; Lavhale *et al.* 2013). Centaquina tem uma meia-vida de cerca de uma hora e um alto volume de distribuição (Gulati *et al.* 2016; O'Donnell *et al.* 2016a; O'Donnell *et al.* 2016b). Química, fabricação e controle bem-sucedidos, juntamente com estudos toxicológicos com camundongo, rato e cão, levaram à conclusão bem-sucedida de um estudo de Fase I humano de centaquina experimental. O estudo foi conduzido em 24 sujeitos humanos e a centaquina foi considerada ser segura e bem tolerada

(Gulati *et al.* 2016). No momento, estudos multicêntricos de Fase II estão em andamento (CTRI/2017/03/008184) em humanos com choque hemorrágico.

[0045] É contemplado que, além de centaquina, outros agentes adrenérgicos α_2 são úteis nos métodos da divulgação. Por exemplo e sem limitação, a divulgação contempla o uso de um agente adrenérgico α_2 selecionado do grupo que consiste em centaquina, clonidina, guanfacina, guanabenz, guanoxabenz, guanetidina, xilazina, tizanidina, metildopa, fadolmidina, amidefrina, amitraz, anisodamina, apraclonidina, brimonidina, cirazolina, detomidina, dexmedetomidina, epinefrina, ergotamina, etilefrina, indanidina, lofexidina, medetomidina, mefentermina, metaraminol, metoxamina, mivazerol, nafazolina, norepinefrina, norfenefrina, octopamina, oximetazolina, fenilpropanolamina, rilmenidina, romifidina, sinefrina, talipexol, sais dos mesmos e uma combinação dos mesmos.

[0046] Sais dos agentes adrenérgicos α_2 também podem ser utilizados nas presentes composições e métodos. Exemplos de sais adequados incluem, mas não estão limitados a, sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos, tal como ácidos nítrico, bórico, clorídrico, bromídrico, sulfúrico e fosfórico, e orgânicos, tal como oxálico, maleico, succínico, tartárico e cítrico. Exemplos não limitantes de sais de agentes adrenérgicos α_2 incluem, porém sem limitação, cloridrato, sais de bromidrato, iodidrato, sulfato, bissulfato, 2-hidroxietanossulfonato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bissulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerolfosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, formato, succinato, fumarato, maleato, ascorbato, isetionato, salicilato, metanossulfonato, mesitilenossulfonato, naftilenossulfonato, nicotinato, 2-naftalenossulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilproprionato, picrato, pivalato, propionato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, undecanoato, lactato, citrato, tartarato, gluconato, metanossulfonato, etanodissulfonato, benzenossulfonato e p-toluenossulfonato.

[0047] Sais preferidos são sais de ácidos orgânicos, tal como citrato, tartarato, malato, succinato, oxalato, fumarato, maleato, ascorbato, lactato, gluconato, digliconato e aspartato, por exemplo. Um sal mais preferido é um sal citrato, um sal lactato ou um sal tartarato.

[0048] Centaquina, como a base livre, pode ser administrada em uma quantidade de 0,001 a menos de 0,05 mg por kg de peso do indivíduo sendo tratado (mg/kg), de preferência cerca de 0,003 a cerca de 0,04 mg/kg e mais preferencialmente cerca de 0,005 a cerca de 0,03 mg/kg. Mais particularmente, centaquina, como a base livre, é administrada em doses de mg/kg de 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,011, 0,012, 0,013, 0,014, 0,015, 0,016, 0,017, 0,018, 0,019, 0,020, 0,021, 0,022, 0,023, 0,024, 0,025, 0,026, 0,027, 0,028, 0,029, 0,030, 0,031, 0,032, 0,033, 0,034, 0,035, 0,036, 0,037, 0,038, 0,039, 0,040, 0,041, 0,042, 0,043, 0,044, 0,045, 0,046, 0,047, 0,048, ou 0,049 e todas as faixas de subfaixas nas mesmas.

[0049] Centaquina também pode ser administrado na forma de sal, por exemplo, citrato de centaquina, para alcançar os benefícios dos presentes métodos. Citrato de centaquina é administrado numa quantidade de cerca de 0,0001 a cerca de 1,5 mg/kg, preferencialmente cerca de 0,0002 a cerca de 0,8 mg/kg e, mais preferencialmente, cerca de 0,0004 a cerca de 0,5 mg/kg. Em algumas modalidades, citrato de centaquina é administrado em uma quantidade de cerca de 0,0001 a cerca de 1,0 mg/kg. Mais particularmente, citrato de centaquina pode ser administrado em doses de mg/kg (como citrato de centaquina) de cerca de ou de pelo menos cerca de qualquer das seguintes doses: 0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0004, 0,0005, 0,0006, 0,0007, 0,0008, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,011, 0,012, 0,013, 0,014, 0,015, 0,016, 0,017, 0,018, 0,019, 0,020, 0,021, 0,022, 0,023, 0,024, 0,025, 0,026, 0,027, 0,028, 0,029, 0,030, 0,031, 0,032, 0,033, 0,034, 0,035, 0,036, 0,037, 0,038, 0,039, 0,040, 0,041, 0,042, 0,043, 0,044, 0,045, 0,046, 0,047, 0,048, 0,049, 0,05, 0,051, 0,052, 0,053, 0,054,

0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, ou 1,5 e todas as faixas e subfaixas das mesmas.

[0050] Em algumas modalidades, o agente adrenérgico α_2 (por exemplo, centaquina ou um sal da mesma) é coadministrado com um fluido de ressuscitação. O fluido de ressuscitação pode ser uma solução coloide, uma solução cristaloide, sangue, um componente do sangue ou um substituto do sangue. Exemplos não limitativos de soluções coloides e soluções cristaloides são Lactato de Ringer, salina, salina hipertônica, uma solução de albumina, uma solução de dextrano, uma solução de hidroxietil amido, uma solução de gelatina e uma solução de amido. Exemplos de um componente do sangue são plasma, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas, fatores de coagulação, proteínas e hormônios. O substituto do sangue pode ser um substituto do sangue à base de hemoglobina ou um substituto à base de perflorocarbono.

[0051] O fluido de ressuscitação pode ser administrado em uma quantidade de volume de até três vezes a quantidade de volume de fluido, por exemplo, sangue, plasma, água, perdida por um indivíduo. Em algumas modalidades, o fluido de ressuscitação é administrado em uma quantidade de volume inferior e até a quantidade de volume de fluido perdido pelo indivíduo, por exemplo, uma quantidade de volume de 5%, de preferência 10%, ou 20% e até 100% da quantidade de volume de fluido perdido.

Composições/Administração

[0052] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma composição para tratar lesão renal ou insuficiência renal compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620), em que a quantidade terapeuticamente eficaz é de cerca de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda uma quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou sal da mesma, em que a quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou

sal da mesma é administrada a uma dose de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg. Em algumas modalidades, o sal de centaquina é citrato de centaquina.

[0053] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma composição para tratar declínio da função renal aguda ou lesão renal compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou um sal da mesma, em que a quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou sal da mesma é administrada a uma dose de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg. Em algumas modalidades, o sal de centaquina é citrato de centaquina.

[0054] As composições farmacêuticas da divulgação incluem aquelas em que os ingredientes ativos são administrados em uma quantidade eficaz para atingir seu propósito pretendido. Mais especificamente, uma “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir lesão ou insuficiência renal, ou para tratar declínio da função renal agudo. A determinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz está bem dentro da capacidade dos versados na técnica, especialmente à luz da descrição detalhada aqui fornecida.

[0055] Uma “dose terapeuticamente eficaz” se refere à quantidade dos agentes ativos que resulta na obtenção do efeito desejado. Toxicidade e eficácia terapêutica de tais agentes ativos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, determinando a LD_{50} (a dose letal para 50% da população) e a ED_{50} (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 a LD_{50} e a ED_{50}. Um alto índice terapêutico é preferido. Os dados obtidos de tais dados podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem dos agentes ativos de um modo preferido se encontra dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED_{50} com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem

pode variar dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da rota de administração utilizada.

[0056] Para administração a um humano nos métodos aqui divulgados, as dosagens orais de centaquina são de cerca de 0,01 a cerca de 200 mg por dia para um paciente adulto médio (70 kg), tipicamente dividido em duas a três doses por dia. Assim, para um paciente adulto típico, comprimidos ou cápsulas individuais contêm cerca de 0,1 a cerca de 200 mg de centaquina em um veículo ou transportador farmaceuticamente aceitável adequado, para administração em doses únicas ou múltiplas, uma ou várias vezes por dia. Dosagens para administração intravenosa, bucal ou sublingual são tipicamente cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg por dose única, conforme necessário. Na prática, o médico determina o regime de dosagem real que é mais adequado para um paciente individual e a dosagem varia com a idade, o peso e a resposta do paciente particular. As dosagens acima são exemplares do caso médio, mas podem existir casos individuais nos quais dosagens mais altas ou mais baixas são contempladas e elas estão dentro do escopo desta divulgação.

[0057] Conforme discutido em mais detalhes aqui acima, dosagens de um agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) são de cerca de 0,1 a cerca de 0,6 µg/kg para um paciente adulto médio, tipicamente administrado uma, duas ou três vezes por dia. Em algumas modalidades, a dose do agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) é de cerca de 0,3 µg/kg administrada uma, duas ou três vezes por dia. Dosagens do agonista do receptor da ET_B (por exemplo, IRL-1620) estão em um veículo ou transportador farmaceuticamente aceitável adequado. Na prática, o médico determina o regime de dosagem real que é mais adequado para um paciente individual e a dosagem varia com a idade, o peso e a resposta do paciente particular. As dosagens acima são exemplares do caso médio, mas podem existir casos individuais nos quais dosagens mais altas ou mais baixas são contempladas e elas estão dentro do escopo desta divulgação.

[0058] Os agentes ativos da presente divulgação podem ser administrados sozinhos ou em mistura com um transportador farmacêutico selecionado em relação à rota de administração pretendida e à prática farmacêutica padrão. Composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente divulgação assim podem ser formuladas de uma maneira convencional usando um ou mais transportadores fisiologicamente aceitáveis compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam processamento dos agentes ativos que podem ser usados farmaceuticamente.

[0059] Essas composições farmacêuticas podem ser fabricadas de uma maneira convencional, por exemplo, por processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, produção de drágeas, emulsificação, encapsulamento, aprisionamento ou liofilização. A formulação adequada é dependente da rota de administração escolhida. Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz dos agentes ativos é administrada oralmente, a composição está tipicamente na forma de um comprimido, uma cápsula, um pó, uma solução ou um elixir. Quando administrada em forma de comprimido, a composição pode conter adicionalmente um transportador sólido, tal como uma gelatina ou um adjuvante. O comprimido, a cápsula e o pó contêm cerca de 5% a cerca de 95% de um agente ativo da presente invenção e, de preferência, de cerca de 25% a cerca de 90% de um agente ativo da presente invenção. Quando administrada em forma líquida, um transpotador líquido, tal como água, petróleo ou óleos de origem animal ou vegetal podem ser adicionados. A forma líquida da composição pode ainda conter solução salina fisiológica, dextrose ou outras soluções de sacarídeos ou glicóis. Quando administrada em forma líquida, a composição contém cerca de 0,5% a cerca de 90% em peso de agentes ativos e, de preferência, cerca de 1% a cerca de 50% de agentes ativos.

[0060] Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente ativo é administrada por injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, a composição está na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável isenta de

pirogênio. A preparação de tais soluções parenteralmente aceitáveis, tendo em devida consideração o pH, a isotonicidade, a estabilidade e semelhantes, está dentro da perícia na técnica. Uma composição preferida para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea contém tipicamente, além de um composto da presente divulgação, um veículo isotônico.

[0061] Agentes ativos adequados podem ser prontamente combinados com transportadores farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Esses transportadores permitem que os agentes ativos sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas adicionando os agentes ativos a um excipiente sólido, opcionalmente, triturando a mistura resultante e processando a mistura de grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes adequados incluem, por exemplo, enchimentos e preparações de celulose. Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados.

[0062] Os agentes ativos podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolus ou infusão contínua. Formulações para injeção podem ser apresentadas em forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses com um conservante adicionado. As composições podem assumir formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter agentes de formulação, tal como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

[0063] Composições farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas do agente ativo sob a forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões dos agentes ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos ou ésteres de ácidos graxos sintéticos. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a

viscosidade da suspensão. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos compostos e permitem a preparação de soluções altamente concentradas. Alternativamente, uma composição da divulgação pode estar em forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água isenta de pirogênio estéril, antes do uso.

[0064] Os agentes ativos também podem ser formulados em composições retais, tal como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositórios convencionais. Além das formulações descritas anteriormente, os agentes ativos também podem ser formulados como uma preparação de depot. Essas formulações de longa duração podem ser administradas por implantação (por exemplo, subcutânea ou intramuscular) ou por injeção intramuscular. Assim, por exemplo, os agentes ativos podem ser formulados com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivados esparsamente solúveis, por exemplo, como um sal esparsamente solúvel.

[0065] Em particular, os agentes ativos podem ser administrados oralmente, bucalmente ou sublingualmente na forma de comprimidos contendo excipientes, tal como amido ou lactose, ou em cápsulas ou óvulos, sejam sozinhos ou em mistura com excipientes, ou na forma de elixires ou suspensões contendo agentes flavorizantes ou corantes. Essas preparações líquidas podem ser preparadas com aditivos farmaceuticamente aceitáveis, tal como agentes de suspensão. Um agente ativo também pode ser injetado parenteralmente, por exemplo, intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente, intratecalmente, intracisternamente ou intracoronariamente. Para administração parenteral, o agente ativo é mais bem usado na forma de uma solução aquosa estéril que pode conter outras substâncias, por exemplo, sais ou monossacarídeos, tal como manitol ou glicose, para tornar a solução isotônica com sangue.

[0066] Para uso veterinário, os agentes ativos são administrados como uma formulação adequadamente aceitável de acordo com a prática veterinária normal. O veterinário pode prontamente determinar o regime de dosagem e a rota de administração que é mais apropriada para um animal particular.

EXEMPLOS

[0067] Os exemplos a seguir investigaram o efeito do choque hemorrágico e a ressuscitação com centaquina em receptores da endotelina (ET_A e ET_B) em vários tecidos, juntamente com a concentração de ET-1 plasmática e marcadores inflamatórios em um modelo de rato de choque hemorrágico.

[0068] Endotelina-1 (ET-1) age em receptores da ET_A e ET_B e tem sido implicada no choque hemorrágico (choque). O efeito do choque e da ressuscitação na expressão do receptor da ET_A e ET_B foi estudado utilizando salina hipertônica (salina) ou centaquina. Ratos foram anestesiados, um cateter de pressão foi colocado na artéria femoral esquerda; o sangue foi retirado da artéria femoral direita para trazer a pressão arterial média (MAP) até 35 mmHg por 30 minutos, a ressuscitação foi realizada e 90 minutos mais tarde sacrificados para coletar amostras para estimativas bioquímicas. Ressuscitação com centaquina diminuiu lactato sanguíneo e aumentou MAP. Os níveis de proteína do receptor da ET_A ou ET_B permaneceram inalterados no cérebro, coração, pulmão e fígado em seguida a choque ou ressuscitação. Na aorta abdominal, o choque produziu um aumento (140%) em expressão de ET_A que foi atenuado por salina e centaquina; expressão de ET_B não foi alterada em seguida ao choque, mas foi aumentada (79%) por centaquina. Em medula renal, a expressão de ET_A não foi alterada em seguida ao choque, mas diminuiu (-61%) por centaquina; o choque produziu uma diminuição (-34%) em expressão de ET_B que foi completamente atenuada por centaquina e não salina. Mudanças unduzidas por choque em receptores da ET_A e ET_B na aorta e medula renal são revertidas por centaquina e podem estar contribuindo para sua eficácia.

Exemplo 1

Métodos

[0069] Animais. Ratos Sprague-Dawley machos (340 a 380 g) (Envigo, Indianapolis, IN) foram alojados por pelo menos 4 dias em um ambiente com temperatura (23 ± 1 ºC), umidade (50 ± 10%) e luz (6 da manhã às 6 da tarde) controladas antes de serem usados. Alimento e água foram disponibilizados continuamente. O cuidado e o uso dos animais para procedimentos experimentais foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee da Midwestern University. Todos os procedimentos anestésicos e cirúrgicos estavam de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Animal Care Committee.

[0070] Drogas e Produtos Químicos. Citrato de centaquina (PMZ-2010) foi sintetizado na Pharmazz India Private Limited, Greater Noida, India. Uretano (etil carbamato) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), Injeção de Salina Hipertônica, USP (Hospira, Inc, Lake Forest IL, USA) e Injeção de Heparina Sódio, USP (APP Pharmaceuticals, LLC, Schaumburg, IL, USA) foram usados. Kit de ensaio Imunométrico de Enzima de Endotelina-1 (Catálogo Nº 900-020A, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, USA), kit IL-6 ELISA (Catálogo Nº KRC0061, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), kit IL-10 ELISA (Catálogo Nº KRC0101, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) e kit TNFα ELISA (Catálogo Nº ER3TNFA, Thermo Scientific, Rockford, IL) foram usados para várias estimativas.

[0071] Determinação de resposta cardiovascular. Os animais foram anestesiados com uretano dissolvido em salina isotônica. Uretano foi administrado em uma dose de 1,5 g por kg de peso corporal via injeção intraperitoneal. Uretano foi selecionado como um agente anestésico porque ele produz anestesia de longa duração (8-10 horas) com depressão mínima do sistema cardiovascular e respiratório. Ele produz um nível de anestesia cirúrgica caracterizado por preservação de reflexos cardiovasculares (Maggi e Meli 1986). Resumidamente, ratos anestesiados foram imobilizados em uma

placa cirúrgica equipada com almofada de aquecimento controlada. As Po_2, Pco_2 e pH foram mantidas usando uma cânula de traqueotomia conectada a um ventilador de roedor (Modelo 683, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA). A artéria carótida direita foi exposta para medir o desempenho ventricular esquerdo. Sutura cirúrgica (Deknatel, Research Triangle Park, NC) foi presa em torno da extremidade proximal da artéria carótida e um cateter pressão-volume (P-V) ultraminiatura SPR-869 (Millar Instruments, Houston, TX) foi inserido através de uma incisão minúscula feita perto da extremidade proximal da artéria. O terminal P-V do cateter foi conectado a unidade de P-V MPVS-300 através de cabos PEC-4D e CEC-4B e avançado para o ventrículo esquerdo para obter os sinais de P-V. Os sinais foram adquiridos continuamente (1.000 S^{-1}) usando a unidade de P-V MPVS-300 (AD Instruments, Mountain View, CA, USA) e o sistema de aquisição de dados PowerLab 16/30 (AD Instruments). MAP e HR foram medidos canulando a artéria femoral esquerda com cateter de pressão SPR-320 (Millar Instruments), conectado ao amplificador de ponte ML221 (AD Instruments) através de conector AEC-10C e os sinais foram adquiridos (1000 S^{-1}) usando o sistema de aquisição de dados PowerLab 16/30(Gulati *et al.* 2012; Pacher *et al.* 2008). A veia femoral esquerda foi canulada usando tubulação PE 50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) efixada para ressuscitação.

[0072] Determinação de gases de sangue arterial e déficit de base. pH do sangue arterial de linha de base, Po_2, Pco_2, Na^+, K^+ e lactato foram monitorados antes da indução de choque, 30 minutos após indução de choque e 30 e 60 minutos após ressuscitação com veículo ou centaquina. Amostras de sangue (0,15 ml) foram retiradas da cânula arterial usando seringas de amostragem de gás sanguíneo (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) e analisadas usando um analisador pHOx Ultra (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). O déficit de base foi calculado usando a fórmula (Davis *et al.* 1998;Paladino *et al.* 2008):

$SBD=0{,}9287 \times [HCO_3^- - 24{,}4 + 14{,}83 \times (pH-7{,}4)]$

[0073] **Indução de Choque Hemorrágico**. Hemorragia foi induzida retirando sangue da artéria femoral a uma taxa de aproximadamente 0,5 a 1 mL/min. até que uma MAP de 35 mmHg fosse atingida. Esta MAP foi mantida por 30 min. por retirada adicional de sangue, se necessário. O modelo de choque hemorrágico usado no presente estudo é um modelo de roedor bem estabelecido de hemorragia de pressão administrável (Buehler *et al.* 2000; Gulati *et al.* 1997a; Gulati e Sen 1998). O volume de perda de sangue foi de aproximadamente 8,0 ml em cada rato e foi semelhante em vários grupos, chegando a aproximadamente 40% do sangue total. Níveis de hematócritos medidos foram semelhantes em vários grupos. A duração da retirada de sangue foi de aproximadamente 15 minutos.

[0074] **Desenho experimental**. Para determinar o efeito de ressuscitação da centaquina no sistema cardiovascular e nas citocinas plasmáticas em choque hemorrágico, os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, *Grupo 1*: Controle simulado (sem hemorragia) (n=5), *Grupo 2*: Hemorragia sem ressuscitação (n=5); *Grupo 3*: Hemorragia seguida por ressuscitação com salina hipertônica a 3% (veículo) (n=5); *Grupo 4*: Hemorragia seguida por ressuscitação com veículo mais centaquina (0,017 mg/kg) (n=5); e *Grupo 5*: Hemorragia seguida de ressuscitação com veículo mais centaquina (0,05 mg/kg) (n=5). A ressuscitação foi iniciada 30 minutos após indução do choque hemorrágico como uma infusão intravenosa (1 mL/min.) através da veia femoral usando uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Infusion/Withdrawal Pump, Millis, MA). As amostras de sangue, para estimativas bioquímicas, foram coletadas aos 30 minutos da reanimação e os parâmetros cardiovasculares foram monitorados até 60 minutos após o que o animal foi sacrificado. O volume de solução ressuscitadora foi mantido igual ao volume da perda de sangue. Embora isso não represente uma ressuscitação humana típica, este volume foi selecionado para minimizar fatores de confusão e permitir uma determinação mais precisa do efeito de ressuscitação da centaquina.

[0075] Determinação do nível de ET-1 no plasma sanguíneo. A fim de analisar a mudança em nível de ET-1 plasmático após hemorragia seguida por ressuscitação com centaquina, amostras de sangue foram coletadas de ratos de vários grupos 30 minutos após ressuscitação e foram coletadas para tubos de EDTA resfriados (1 $mg.ml^{-1}$ de sangue) contendo aprotinina (500 $KIU.mL^{-1}$ de sangue). As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.600 x g por 15 minutos a 0°C e o nível de ET-1 plasmático foi estimado usando imunoensaio enzimático. Resumidamente, amostras de plasma e padrões foram adicionados a poços revestidos com um anticorpo monoclonal específico para ET-1. A placa foi, então, lavada após 24 horas de incubação e foi, então, adicionado anticorpo monoclonal marcado com peroxidase de rábano (HRP). Após 30 minutos de incubação, a placa foi lavada e foi adicionada uma solução de substrato de 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina que gerou uma cor azul. Ácido clorídrico (1N) foi adicionado para interromper a reação do substrato e a cor amarela resultante foi lida a 450 nm usando detector DTX 800 Multimode e os dados foram analisados com Software de Detecção Multimode (Beckman Coulter, Inc., Harbor Boulevard, Fullerton, CA). A densidade óptica medida é diretamente proporcional à concentração de ET-1 (Lavhale et al. 2010).

[0076] Estimativa da expressão do receptor de ET_A e ET_B. A expressão dos receptores de ET_A e ET_B foi determinada usando a técnica de Western blotting (Briyal *et al.* 2015; Leonard e Gulati 2013) com algumas modificações. Após conclusão de experimentos cardiovasculares, os animais foram sacrificados e os órgãos (cérebro, coração, fígado, pulmão, rim e aorta abdominal) foram imediatamente dissecados, congelados imediatamente em gelo seco e armazenados a -80°C para análise posterior. O tecido foi homogeneizado com tampão de lise 10x (p/v) RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 120 mM NaCl, 1,0% TritonX-100, 1,0% desoxicolato de sódio, 0,1% sódio dodecil sulfato (SDS), 10% glicerol, 1 mM ácido dissódio etileno diamina tetracético (EDTA), 1 mM sal tetrassódico de ácido etileno glicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), inibidores de fosfatase e comprimido de

coquetel de inibidor de Mini Protease Completa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Proteínas foram isoladas em forma solubilizada e concentrações foram medidas pelo reagente de fenol de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.* 1951). Proteína solubilizada (60 µg) foi desnaturada em tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), resolvida em eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e, então, transferida para a membrana de nitrocelulose seguida por bloqueio da membrana com Tampão de Bloqueio SuperBlock® em salina tris-tamponada (TBS) (ThermoFisher Scientific, Hanover Park, IL). As membranas foram lavadas três vezes com 1x TBS-Tween (TBST) e incubadas com receptor anti-ET_A policlonal (ab85163, Abcam, Cambridge, MA, 1:1.000) ou receptor anti-ET_B (ab117529, Abcam, Cambridge, MA, 1:1.000) ou anticorpos monoclonais anti-β-actina (a1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguidas por anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (HRP) de cabra anti-coelho (sc2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, 1:2.000) ou anti-camundongo de cabra (ab98693, Abcam, Cambridge, MA, 1:10.000) e visualizadas por Substrato Quiioluminescente SuperSignal® West Pico (ThermoFisher Scientific, Hanover Park, IL) usando o Sistema de Imageamento ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e depois analisadas usando software ImageJ (NIH).

[0077] Determinação de níveis de IL-6, IL-10 e TNF-α no plasma sanguíneo. Níveis plasmáticos de IL-6, IL-10 e TNF-α foram estimados usando kits de ensaio imunossorvente ligado a enzima de rato disponíveis comercialmente: IL-6 (Invitrogen Corporation, com um limite de detecção inferior de 5 pg/ml; altamente específico para IL-6 de rato sem reatividade cruzada com outras citocinas), IL-10 (Invitrogen Corporation, com um limite de detecção inferior de 5 pg/ml; altamente específico para IL-10 de rato sem reatividade cruzada com outras citocinas) e kit ELISA TNF-α (Thermo Scientific, com um limite de detecção inferior de 15 pg/ml; altamente específico para TNF-α de rato sem reatividade cruzada com outras citocinas) foram usados para

várias estimativas. Todos os ensaios foram realizados usando amostras de plasma que não foram previamente descongeladas de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes.

[0078] **Análise Estatística**. Uma Análise de Potência foi conduzida usando GraphPad Instat-2.00. A potência foi ajustada para 80% (beta = 0,8) e o nível de significância (alfa) utilizado foi de 0,05. Análise de Potência indicou que um tamanho de amostra de 5 para estimativa cardiovascular e 4 para estimativa bioquímica por grupo foi suficiente para atingir uma potência de 80%, quando nível de significância alfa=0,05. Dados são apresentados como média ± S.E.M. A significância de diferenças foi estimada por uma análise de variância unilateral seguida por um teste post hoc (método de Bonferroni). Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado ser significativo. A análise estatística foi processada com GraphPad Prism 7.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Resultados

[0079] **Efeito de centaquina em pH do sangue arterial, pO_2, pCO_2, hematócrito, lactato sanguíneo e déficit de base de ratos hemorragidos**. Uma redução significativa no pH sanguíneo foi observada em ratos em seguida a hemorragia, a qual foi diminuída ainda em seguida a administração de salina hipertônica. A administração de centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg) preveniu significativamente a redução de pH em ratos hemorragidos. Hemorragia produziu uma diminuição significativa em pCO_2 e aumento em pO_2 que não foram afetados por ressuscitação com salina hipertônica ou centaquina (Tabela 1).

[0080] Não houve nenhuma mudança na porcentagem de hematócrito em ratos de controle durante todo o período experimental, enquanto o hematócrito baixou significativamente ($p<0,001$) após hemorragia. Ratos hemorragidos, quando ressuscitados com salina hipertônica ou com doses de 0,017 e 0,05 mg/kg de centaquina, não mostraram nenhuma mudança em hematócrito após tratamento.

[0081] Não houve nenhuma mudança em níveis de lactato no sangue em ratos de controle durante todo o período experimental, enquanto níveis de lactato foram aumentados significativamente ($p<0,001$) em seguida a hemorragia. Ratos hemorragidos, quando ressuscitados com doses de 0,017 e 0,05 mg/kg de centaquina, mostraram uma diminuição significativa ($p<0,001$) em níveis de lactato sanguíneo em comparação com o grupo de salina hipertônica (Tabela 1). Não houve nenhuma mudança no déficit de base dos ratos de controle durante o período experimental. O déficit de base aumentou significativamente ($p<0,001$) após indução de hemorragia, que não foi afetado por ressuscitação com salina hipertônica. Ratos ressuscitados com doses de 0,017 e 0,05 mg/kg de centaquina, por outro lado, mostraram uma diminuição significativa ($p<0,001$) em déficit de base (-12,0 ± 0,2 e -11,6 ± 0,5, respectivamente) em comparação com salina hipertônica (-16,3 ± 1,3) (Tabela 1). Ratos hemorrágicos que não foram ressuscitados não puderam sobreviver até 60 min. e, daí, nenhum dado pode ser obtido naquele ponto no tempo.

Tabela 1. Efeito da centaquina em níveis de hematócrito, pH do sangue arterial, pCO_2, pO_2, lactato e déficit de base em ratos hemorragidos. Os valores são expressos como média ± S.E.M. *$p< 0,05$ em comparação com a linha de base; #$p < 0,05$ em comparação com hemorragia; $^{\Delta}p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo.

	Tempo	Simulação Controle	Hemorragia (sem ressuscitação)	Hemorragia (salina a 3%)	Hemorragia (centaquina; 0,017 mg/kg)	Hemorragia (centaquina; 0,05 mg/kg)
Hematócrito (%)	Linha de base	36,0 ± 2,4	38,3 ± 0,8	38,3 ± 0,8	36,8 ± 1,3	39,3 ± 1,6
	Choque H.	38,3 ± 0,8	24,7 ± 2,4*	22,2 ± 1,5*	24,8 ± 1,5*	22,2 ± 0,7*
	60 min.	36,5 ± 1,5		19,5 ± 1,8	21,5 ± 1,8	21,3 ± 1,3
pH	Linha de base	7,40 ± 0,01	7,36 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,38 ± 0,01
	Choque H.	7,39 ± 0,01	7,22 ± 0,02*	7,17 ± 0,03*	7,23 ± 0,02*	7,25 ± 0,03*
	60 min.	7,38 ± 0,01		7,13 ± 0,02	7,24 ± 0,02Δ	7,28 ± 0,01Δ
pCO_2 (mmHg)	Linha de base	32,5 ± 2,1	33,6 ± 1,1	33,3 ± 1,2	33,8 ± 1,2	34,5 ± 2,1
	Choque H.	29,3 ± 2,1	15,8 ± 0,7*	15,9 ± 1,1*	15,9 ± 0,9*	16,3 ± 1,5*
	60 min.	30,8 ± 2,2		27,8 ± 2,8#	26,0 ± 1,6#	27,3 ± 1,9#
pO_2 (mmHg)	Linha de base	122,2 ± 4,3	125,9 ± 5,7	120,3 ± 1,2	125,5 ± 1,9	120,2 ± 1,2
	Choque H.	121,7 ± 3,9	142,6 ± 1,3*	140,3 ± 5,6*	145,6 ± 1,9*	142,8 ± 1,8*
	60 min.	112,3 ±3,9		128,3 ± 4,8	131,3 ± 5,4#	121,3 ± 4,6#
Lactato (mmol/L)	Linha de base	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1
	Choque H.	1,7 ± 0,1	7,4 ± 0,2*	7,3 ± 0,2*	7,6 ± 0,3*	7,4 ± 0,4*
	60 min.	1,2 ± 0,1		3,7 ± 0,2#	1,9 ± 0,1#Δ	1,7 ± 0,2#Δ
Déficit de base (mEq/L)	Linha de base	-2,7 ± 0,4	-2,4 ± 0,3	-2,4 ± 0,4	-2,9 ± 0,3	-2,8 ± 0,3
	Choque H.	-2,9 ± 0,5	-15,7 ± 1,5*	-16,1 ± 0,6*	-15,3 ± 0,4*	-15,4 ± 0,9*
	60 min.	-3,9 ± 0,4		-16,3 ± 1,3	-12,0 ± 0,2#Δ	-11,6 ± 0,5#Δ
ET-1	60 min.	13,6 ± 0,9	21,8 ± 0,9*	25,3 ± 1,35*	37,9 ± 3,0*#Δ	38,3 ± 2,7*#Δ

[0082] Efeito da centaquina em pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos hemorragidos. Ratos de controle não mostraram qualquer mudança em MAP durante o período experimental. MAP diminuiu significativamente ($p<0,001$) em todos os grupos de tratamento após indução de hemorragia. Ratos hemorragidos, ressuscitados com salina hipertônica, não mostraram nenhuma melhora em MAP em 30 ou 60 minutos pós-ressuscitação. Ratos ressuscitados com centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg) mostraram aumento significativo ($p<0,01$) em MAP por pelo menos 60 minutos pós-ressuscitação (Figura 1). Antes da hemorragia, a HR basal era de aproximadamente 345 batimentos/min. em todos os grupos. A hemorragia

produziu ligeiro aumento em HR (aproximadamente 372 batimentos/min.). Em ratos ressuscitados com salina hipertônica, a HR caiu para 353 ± 11 batimentos/min. em 60 minutos, enquanto em ratos ressuscitados com centaquina nas doses de 0,017 e 0,05 mg/kg a HR foi de 361 ± 10 e 363 ± 10, respectivamente (Figura 1). Nenhuma diferença significativa foi observada em HR em seguida a ressuscitação com salina hipertônica ou centaquina.

[0083] Efeito da centaquina no débito cardíaco e na resistência vascular sistêmica de ratos hemorragidos. CO diminuiu significativamente em seguida a hemorragia em todos os grupos. Ratos hemorragidos ressuscitados com salina hipertônica e centaquina produziram ambos um aumento significativo em CO (Figura 1). A ressuscitação com centaquina aumentou significativamente o CO 30 e 60 minutos pós-ressuscitação em comparação com salina hipertônica sozinha. SVR diminuiu de 148 ± 5 para 77 ± 3 dine*s/cm^5 em seguida a hemorragia e ele diminuiu ainda mais em 30 e 60 minutos de ressuscitação com ambos os tratamentos com salina hipertônica ou centaquina (Figura 1).

[0084] Efeito da centaquina em nível de ET-1 no plasmade ratos hemorragidos. Os níveis de ET-1 no plasma de linha de base foram de 13,6 ± 0,87 $pg.ml^{-1}$. Após hemorragia, os níveis de ET-1 foram aumentados significativamente para 21,8 ± 0,87 $pg.ml^{-1}$ ($p<0,001$). Em ratos tratados com salina hipertônica, os níveis de ET-1 foram de 25,3 ± 1,35 $pg.ml^{-1}$, sem nenhuma mudança significativa em comparação com o grupo de choque hemorrágico não tratado. No entanto, em ratos tratados com centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg), os níveis de ET-1 foram aumentados significativamente (37,9 ± 3,03 e 38,3 ± 2,7 $pg.ml^{-1}$, respectivamente) em comparação com ratos hemorragidos ressuscitados com salina hipertônica.

[0085] Efeito da centaquina na expressão de receptores de ET_A em ratos hemorragidos. Não houve nenhuma mudança na expressão dos receptores de ET_A no cérebro, coração, fígado, pulmões e córtex renal (Figura 2). Um aumento significativo ($p<0,0001$) na expressão dos receptores de ET_A foi

observado em seguida a choque hemorrágico na aorta abdominal. A expressão dos receptores de ET_A na aorta abdominal de ratos hemorragidos aumentou em 140% em comparação com o grupo de simulação. Em ratos hemorragidos tratados com salina hipertônica e salina hipertônica + centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg), uma diminuição significativa (-48,8, -47,6 e -49,2%, respectivamente) em expressão de ET_A foi observada na aorta abdominal em comparação com ratos hemorragidos sem tratamento (Figura 2). Nenhuma mudança na expressão de ET_A foi observada na medula renal após choque hemorrágico em ratos. No entanto, ratos tratados com centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa (-61,3% e -70,5%, respectivamente) na expressão dos receptores de ET_A em comparação ao choque hemorrágico (Figura 2).

[0086] Efeito da centaquina na expressão de receptores de ET_B em ratos hemorragidos. Não houve nenhuma mudança na expressão dos receptores de ET_B em cérebro, coração, fígado, pulmões e córtex renal (Figura 3). Nenhuma mudança na expressão de ET_B foi observada na aorta abdominal em seguida a choque hemorrágico em ratos. No entanto, a expressão de receptores de ET_B na aorta abdominal de ratos tratados com centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg) aumentou significativamente (79,7% e 57,4%, respectivamente) em comparação com ratos hemorragidos não tratados (Figura 3). Uma diminuição significativa ($p<0,0001$) (-34%) na expressão de receptores de ET_B foi observada em seguida a choque hemorrágico na medula renal em comparação com o grupo de simulação. Em ratos hemorrágicos tratados com centaquina (0,017 e 0,05 mg/kg), um aumento significativo (76,6% e 69,4%, respectivamente) na expressão de ET_B foi observado na medula renal em comparação com ratos hemorragidos não tratados (Figura 3).

[0087] Efeito da centaquina nos níveis plasmáticos de IL-6, IL-10 e TNF-α de ratos hemorragidos. Para avaliar ainda mais se o tratamento de centaquina afetou a resposta inflamatória, medimos um painel selecionado de citocinas em plasma de rato. No geral, os níveis de IL-6, IL-10 e TNF-α no

plasma foram aumentados em todos os ratos hemorragidos com ou sem ressuscitação com salina hipertônica e centaquina. Os níveis de TNF-α e IL-6 foram mais altos após choque hemorrágico e ressuscitação com salina hipertônica em comparação com controle de simulação. Centaquina aumentou ainda mais ($p<0,01$) os níveis de TNF-α e IL-6 em comparação com salina hipertônica sozinha. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa em IL-10 plasmática entre ratos após choque hemorrágico e ressuscitação com salina hipertônica ou centaquina (Figura 4).

Discussão

[0088] Centaquina diminuiu significativamente lactato sanguíneo e restaurou MAP e intensificou o efeito de ressuscitação de salina hipertônica, confirmando achados anteriores (Gulati *et al.* 2012; Gulati *et al.* 2013; Lavhale *et al.* 2013; Papapanagiotou *et al.* 2016). O efeito do choque hemorrágico e da ressuscitação usando salina hipertônica sozinha ou com centaquina na expressão dos receptores de ET_A e ET_B em diferentes tecidos, níveis de ET-1 plasmáticos e marcadores inflamatórios foram determinados. Foi descoberto que receptores de ET_A e ET_B na aorta abdominal e medula renal estão envolvidos em sua ação ressuscitadora. Nenhuma mudança em níveis do receptor de ET_A ou ET_B foi observada no cérebro, coração, pulmão e fígado em seguida a choque hemorrágico ou ressuscitação com qualquer de salina hipertônica ou centaquina.

[0089] Receptores de ET_A vasculares foram bem estabelecidos para ter um forte efeito vasoconstritor (Schneider *et al.* 2007). Hemorragia produziu um aumento na expressão de receptores de ET_A na aorta abdominal. A ressuscitação com salina hipertônica e centaquina reverteu significativamente o aumento induzido por hemorragia na expressão do receptor de ET_A na aorta abdominal. No entanto, receptores de ET_B não foram alterados em seguida a choque hemorrágico, mas foram aumentados por tratamento de centaquina. É possível que em seguida a choque hemorrágico ocorra um aumento na expressão dos receptores da ET_A vasoconstritores nos vasos sanguíneos para

manter o tônus vascular e MAP. No entanto, um aumento na ET-1 circulante junto com receptores de ET_A vasculares pode produzir vasoconstrição indesejada e reduzir a perfusão de tecido.

[0090] Por outro lado, foi relatado que um aumento nos níveis de ET-1 no plasma em seguida a choque hemorrágico age como um mecanismo compensatório para manter pressão arterial (Chang *et al.* 1993; Edwards *et al.* 1994; Gulati *et al.* 1997b; Sharma *et al.* 2002). Também foi descoberto que um precursor de ET-1 melhorou o efeito de ressuscitação de hemoglobina reticulada de diaspirina substituta de sangue baseada em hemoglobina em ratos severamente hemorragidos (Gulati *et al.* 1995). Em ratos normais, ET-1 produz uma resposta bifásica: uma diminuição transiente inicial seguida por um aumento sustentado na pressão arterial (Gardiner *et al.* 1994; Yanagisawa *et al.* 1988), no entanto, em ratos hemorragidos, ET-1 produziu um efeito monofásico onde apenas um aumento na pressão arterial foi observado junto com sobrevivência melhorada (Jochem *et al.* 2003). O efeito de ressuscitação da ET-1 em ratos hemorragidos foi mediado pelos receptores de ET_A, uma vez que ele foi bloqueado por BQ123, um antagonista específico do receptor de ET_A (Jochem *et al.* 2003) Sem desejar ser limitado pela teoria, os receptores de ET_A vasculares são aumentados em seguida a choque hemorrágico como parte do mecanismo compensatório que é revertido mediante ressuscitação com qualquer de salina hipertônica ou centaquina. Os receptores de ET_B na aorta abdominal estavam inalterados em seguida a choque hemorrágico, mas aumentados por centaquina e não por ressuscitação de salina hipertônica. Uma vez que os receptores de ET_B vasculares produzem vasodilatação (Arai *et al.* 1990; Cardillo *et al.* 2000; Yanagisawa *et al.* 1988), portanto, o aumento induzido por centaquina na expressão de receptores de ET_B vasculares pode contribuir para um aumento em perfusão sanguínea do tecido, desse modo diminuindo os níveis de lactato no sangue de ratos hemorragidos.

[0091] Os receptores de ET cruzam entre si e com adrenérgicos. O efeito da dessensibilização do receptor de ET_B é revelado na presença de bloqueio do

receptor de ET_A (Mickley *et al.* 1997). Por outro lado, receptores de ET_B são capazes de alterar a farmacologia dos receptores de ET_A. Foi demonstrado que o bloqueio do receptor de ET_A venosos inibiu a contração induzida por ET-1 em um grau maior quando os receptores de ET_B foram bloqueados (Thakali *et al.* 2008). Foi demonstrado que cruzamento entre receptores de ET_A e ET_B ocorre em vários vasos sanguíneos diferentes em roedores (Lodge *et al.* 1995; Thakali *et al.* 2008) e todos esses vasos possuem receptores de ET_A e ET_B contráteis e sugerem que a interação farmacológica dos receptores de ET_A e ET_B requer a presença de receptores de ET_B contráteis (Thakali *et al.* 2008). Foi demonstrado que os receptores de ET_A modulam as respostas cardiovasculares do agente adrenérgico, tal como clonidina (Gulati 1992; Gulati and Srimal 1993; Lavhale *et al.* 2013). Uma vez que centaquina age em receptores adrenérgicos, é possível que mudanças na expressão dos receptores de ET_A sejam responsáveis por alguns dos efeitos de ressuscitação da centaquina.

[0092] É demonstrado aqui que na medula renal, os níveis do receptor de ET_A permaneceram inalterados em seguida ao choque hemorrágico, mas foram diminuídos por centaquina, ao passo que a expressão do receptor de ET_B diminuiu em seguida a choque hemorrágico, o que foi completamente atenuado por centaquina e não com salina hipertônica. No rim, ET-1 produz vasoconstrição e diminui a taxa de filtração glomerular, que é mediada por receptores de ET_A (Harris *et al.* 1991; Kon *et al.* 1989). Uma diminuição na expressão dos receptores de ET_A induzida por centaquina poderia reduzir o efeito vasoconstritor de ET-1 na medula renal. A medula renal externa é o sítio onde ocorre reabsorção extensiva de cloreto de sódio pelo ramo ascendente espesso da alça de Henle, tornando a medula renal externa um sítio de alta atividade metabólica e demanda por melhor perfusão sanguínea (Cowley 2008). Portanto, essa região é altamente propensa a lesão hipóxica ou isquêmica em seguida a hemorragia excessiva. É possível que centaquina, ao diminuir a concentração dos receptores de ET_A, impeça a região medular renal

de lesão isquêmica em seguida a choque hemorrágico. Por outro lado, a estimulação do receptor de ET_B foi considerada aumentar fluxo sanguíneo medular renal mediado por vasodilatadores, tal como NO, ciclo-oxigenase e metabólitos do citocromo p-450 (Hercule and Oyekan 2000; Vassileva *et al.* 2003). Como mostrado aqui, o choque hemorrágico diminuiu a expressão do receptor de ET_B medular renal que não foi afetada por ressuscitação com salina, mas foi atenuada por centaquina. Os resultados fornecidos aqui mostram que a hemorragia severa produz uma diminuição na expressão dos receptores de ET_B na medula renal, o que pode contribuir para uma diminuição no fluxo sanguíneo para a medula renal, causando isquemia e insuficiência renal. Uma vez que a ressuscitação com centaquina não produziu nenhuma diminuição na expressão do receptor de ET_B medular renal, é possível que os efeitos isquêmicos medulares renais induzidos por hemorragia possam ser atenuados por centaquina. Portanto, mudanças induzidas por centaquina em receptores de ET_A e ET_B podem estar contribuindo para livrar a medula renal de lesão isquêmica em seguida a choque hemorrágico.

[0093] Os receptores da ET_B medulares renais também desempenham um papel no controle da excreção de sódio e água (Kohan *et al.* 2011; Schneider *et al.* 2007). Os receptores da ET_B no epitélio dos ductos coletores medulares renais são principalmente responsáveis por inibição da ação da ET-1 na reabsorção de sódio e água (Kitamura *et al.* 1989; Kohan *et al.* 2011). A resposta diurética e natriurética para ET-1 foi considerada ser atenuada por um antagonista do receptor da ET_B (Hoffman *et al.* 2000). Pacientes com perda excessiva de sangue apresentando anúria ou oligúria exigem atenção médica de emergência porque a insuficiência renal aguda é a principal causa de morte em tais pacientes (Rossaint *et al.* 2006). É possível que uma diminuição na expressão dos receptores da ET_B medulares renais possa contribuir para oligúria, o que poderia ser atenuado por centaquina. Pode-se especular que centaquina pode ser uma nova intervenção farmacológica para reduzir lesão renal mediada por choque hemorrágico. Esses achados são preliminares e

apenas sugestivos, eles precisam ser extennsivamente investigados em estudos com animais. São necessários estudos para investigar o efeito da centaquina em fluxo sanguíneo renal e se essas mudanças podem ser antagonizadas por antagonistas dos receptores de ET_A e ET_B específicos.

[0094] No presente estudo, verificou-se que a hemorragia aumentou a concentração plasmática de ET-1, TNF-α, IL-6 e IL-10. A ressuscitação com salina hipertônica não alterou ET-1, TNF-α, IL-6 ou IL-10 no plasma; no entanto, centaquina aumentou significativamente ET-1, TNF-α e IL-6 no plasma sem afetar a concentração de IL-10 no plasma. Em um estudo conduzido em cães sem raça definida, foi observado um aumento nos níveis da ET-1 no plasma em seguida a hemorragia que está correlacionado com a quantidade de perda de sangue (Chang *et al.* 1993). ET-1 aumenta a produção de ânion superóxido e secreção de citocina (Kowalczyk *et al.* 2015; Virdis and Schiffrin 2003), junto com ativação de fatores de transcrição, tal como NF-κB e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tal como TNF-α, IL-1 e IL-6. Citocinas, reciprocamente, demonstraram modular a secreção deET-1 (Breuiller-Fouche *et al.* 2005;Yeager *et al.* 2012).

[0095] Choque hemorrágico compromete as respostas metabólicas, celulares e inflamatórias que podem levar à falência múltipla de órgãos (Bonanno 2011; Gutierrez *et al.* 2004; Marik e Flemmer 2012). A resposta é tipicamente caracterizada por liberação de citocinas pró-inflamatórias, tal como IL-6 ou TNF-α, aparecendo imediatamente em seguida a choque hemorrágico (Mees *et al.* 2009). Isso é seguido por uma liberação sustentada de citocinas anti-inflamatórias, tal como IL-10, o que pode contribuir para depressão imune (Oberholzer *et al.* 2000). O impacto global da produção excessiva de IL-6 e TNF-α na hemorragia ainda é controverso. Os presentes achados confirmam aumentos nos níveis plasmáticos de TNF-α, IL-6 e IL-10 após hemorragia. A ressuscitação com salina hipertônica não alterou TNF-α, IL-6 ou IL-10 no plasma; entretanto, centaquina aumentou significativamente TNF-α e IL-6 no plasma sem afetar a concentração de IL-10 no plasma. Investigações

anteriores mostraram que uma expressão elevada de receptores da ET_B pode estar correlacionada com um aumento em certas citocinas pró-inflamatórias (Breuiller-Fouche *et al.* 2005; Pernow *et al.* 2000; White *et al.* 2000). É demonstrado aqui que ressuscitação com centaquina aumentou a expressão do receptor da ET_B na aorta abdominal e medula renal, juntamente com a elevação da concentração de TNF-α e IL-6 no plasma. Estudos sugeriram que uma resposta robusta de TNF-α inicial está associada à sobrevivência em vítimas de trauma e a elevação precoce de TNF-α no plasma serve ou para limitar danos a órgãos ou para induzir processos reparadores (Namas *et al.* 2009). A citocina IL-6 parece desempenhar um papel significativo na resposta sistêmica à inflamação. Embora vários estudos tenham mostrado efeito benéfico do bloqueio de IL-6 em artrite (Peake *et al.* 2006), mieloma múltipo (Gado *et al.* 2000) e doença de Crohn (Atreya *et al.* 2000), a inibição de IL-6 não foi considerada benéfica em choque hemorrágico (Mees *et al.* 2009). IL-6 desempenha um papel duplo na resposta inflamatória à lesão, frequentemente classificada como pró-inflamatória localmente e antiinflamatória sistemicamente. Estudos têm mostrado os efeitos benéficos da deficiência de IL-6 em paradigmas experimentais de lesão térmica, sepse e hemorragia (Fontanilla *et al.* 2000; Mommsen *et al.* 2011; Yang *et al.* 2007). Em contraste, outros estudos demonstram que a administração de IL-6 previne apoptose de células epiteliais e cardiomiócitos induzida por hemorragia (Alten *et al.* 2008; Moran *et al.* 2009). A infusão sistêmica de IL-6 emseguida a choque hemorrágico reduz a inflamação e lesões no fígado e pulmão (Meng *et al.* 2000). Estudos também mostraram os efeitos benéficos de TNF-α. Camundongos sem receptores de TNF têm infartos maiores em lesão cerebral isquêmica (Bruce *et al.* 1996). A liberação de TNF-α no hipocampo pode promover neuroproteção e ativar processos de reparo da microvasculatura cerebral, bem como mediar plasticidade neuronal (Kim *et al.* 2014; Sriram e O'Callaghan 2007). Vários estudos experimentais sugerem que ambas as citocinas exibem ações protetoras no cérebro (Bruce *et al.* 1996; Gadient *et al.*

1990; Hama *et al.* 1989; Kossmann *et al.* 1996). Embora centaquina aumentasse IL-6 e TNF-α no presente estudo, mais marcadores para inflamação estão sendo examinados a fim de compreender completamente a influência da centaquina em inflamação, tanto em animais normais quanto hemorragidos, visto que essas citocinas têm a capacidade de realizar funções tanto pró quanto anti-inflamatórias.

[0096] Endotelina-1 (ET-1) age em receptores da ET_A e ET_B e tem sido implicada no choque hemorrágico (choque). O efeito do choque e da ressuscitação na expressão do receptor de ET_A e ET_B foi estudado aqui utilizando salina hipertônica (solução salina) ou centaquina. Ratos foram anestesiados, um cateter de pressão foi colocado na artéria femoral esquerda; o sangue foi retirado da artéria femoral direita para trazer a pressão arterial média (MAP) até 35 mmHg por 30 minutos, a ressuscitação foi realizada e 90 minutos mais tarde sacrificados para coletar amostras para estimativas bioquímicas. Ressuscitação com centaquina diminuiu lactato sanguíneo e aumentou MAP. Os níveis de proteína do receptor da ET_A ou ET_B permaneceram inalterados no cérebro, coração, pulmão e fígado em seguida a choque ou ressuscitação. Na aorta abdominal, o choque produziu um aumento (140%) em expressão de ET_A que foi atenuado por salina e centaquina; expressão de ET_B não foi alterada em seguida ao choque, mas foi aumentada (79%) por centaquina. Em medula renal, a expressão de ET_A não foi alterada em seguida ao choque, mas diminuiu (-61%) por centaquina; o choque produziu uma diminuição (-34%) em expressão de ET_B que foi completamente atenuada por centaquina e não salina. Mudanças unduzidas por choque em receptores da ET_A e ET_B na aorta e medula renal são revertidas por centaquina e podem estar contribuindo para sua eficácia.

[0097] Em resumo, centaquina melhorou significativamente a ressuscitação em seguida a choque hemorrágico (HS) em ratos. A administração de centaquina emseguida a HS resultou em uma diminuição na expressão do receptor da ET_A vasoconstritor e no aumento na expressão de receptores da

ET_B vasodilatadores, o mecanismo para essas alterações ainda não foi determinado. Da mesma forma, a significância da elevação nas citocinas emseguida a choque hemorrágico e ressuscitação com centaquina é contemplada por essas mudanças melhorarem a perfusão sanguínea de tecido.

[0098] Centaquina demonstrou ter efeito ressuscitador significativo em seguida a hemorragia extensiva em modelos de ratos, coelhos e suínos. Hemorragia diminui a expressão dos receptores da ET_B e é contemplado que a ressuscitação com centaquina atenua esse efeito pela elevada expressão dos receptores da ET_B. Especificamente, o aumento induzido por centaquina na expressão do receptor de ET_B na medula renal pode levar a um efeito vasodilatador e promover diurese e natriurese, evitando lesão da medula renal.

Exemplo 2

[0099] O exemplo a seguir estabelece que doses baixas de centaquina (2-[2-(4-(3-metifenil)-1-piperazinil)]etil-quinolina)citrato, diminuíram significativamente lactato no sangue e aumentaram a pressão arterial média (MAP), pressão do pulso (PP) e débito cardíaco (CO) em choque hemorrágico (Gulati et al. 2012; Gulati et al. 2013; Lavhale et al. 2013; Papapanagiotou et al. 2016). Estudos comparativos foram realizados entre centaquina e agentes de ressuscitação status quo agrupados em 3 categorias diferentes: (a) fluidos, tal como Ringer Lactado, salina hipertônica; (b) agentes adrenérgicos, talcomo norepinefrina e (c) sangue fresco. Nossos resultados usando (i) um modelo de rato de perda de sangue de pressão fixa, (ii) um modelo de coelho de sangramento descontrolado com trauma e (iii) um modelo de porco de perda massiva de sangue indicam que centaquina é altamente eficaz em reduzir a mortalidade em seguida a choque hipovolêmico (Gulati et al. 2012; Gulati et al. 2013; Lavhale et al. 2013; Papapanagiotou et al. 2016). Ao contrário de outros agentes ressuscitadores (vasopressores), centaquina aumentou MAP aumentando o volume sistólico (SV) e CO; e frequência cardíaca e resistência vascular sistêmica (RVS) diminuídas. Centaquina está atualmente em

desenvolvimento clínico como um agente de ressuscitação para choquehemorrágico.

[0100] Choque hemorrágico é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em seguida a trauma, particularmente durante os estágios iniciais da lesão (Wu *et al.* 2009). A maioria das mortes devido a choque hemorrágico ocorre nas primeiras 6 horas após trauma (Shackford *et al.* 1993) and many of these deaths can be prevented (Acosta *et al.* 1998). Choque é acompanhado por insuficiência circulatória, que é principalmente responsável por mortalidade e morbidade. A fluidoterapia atualmente recomendada de usar grandes volumes de solução de Ringer lactada (LR) é eficaz na restauração dos parâmetros hemodinâmicos, mas apresenta limitações logísticas e fisiológicas (Vincenzi *et al.* 2009). Ressuscitação com um grande volume de cristaloides foi associada à síndrome compartimental abdominal secundária, edema pulmonar, disfunção cardíaca e íleo paralítico (Balogh *et al.* 2003). Uma sequela secundária de insuficiência circulatória em choque hemorrágico é insuficiência renal, que pode ser exacerbada por ressuscitação de fluido de grande volume. A incidência de lesão renal aguda e insuficiência renal em seguida a choque hemorrágico é extremamente alta, com muitos requerendo terapia de substituição renal. A fisiopatologia de insuficiência renal em choque hemorrágico é um resultado da vasoconstrição esplâncnica e renal que dirige fluxo sanguíneo para o coração e o cérebro, mas pode levar a lesão isquêmica do rim. Lesão de células tubulares é mais proeminente na porção reta dos túbulos proximais e no ramo ascendente espesso da alça de Henle, especialmente quando ela mergulha na medula relativamente hipóxica. Mudanças nas células tubulares proximais são bolhas apicais e perda da membrana da borda em escova seguida por uma perda de polaridade e integridade das junções estreitas. A nível celular, a isquemia causa depleção de adenosina trifosfato (ATP), umaumento no cálcio citosólico, formação de radicais livres, metabolismo dos fosfolipídios de membrana e anormalidades na regulação do volume celular.

Métodos

[0101] Estudos em Animais. Ratos Sprague-Dawley machos (340 a 380 g) (Envigo, Indianapolis, IN) foram alojados por pelo menos 4 dias em um ambiente com temperatura (23 ± 1 ºC), umidade (50 ± 10%) e luz (6 da manhã às 6 da tarde) controladas antes de serem usados. Alimento e água foram disponibilizados continuamente. O cuidado e o uso dos animais para procedimentos experimentais foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee da Midwestern University. Todos os procedimentos anestésicos e cirúrgicos estavam de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Animal Care Committee.

[0102] Drogas e Produtos Químicos. Citrato de centaquina (PMZ-2010) foi sintetizado na Pharmazz India Private Limited, Greater Noida, India. Uretano (etil carbamato) (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), Injeção de Salina, USP (Hospira, Inc, Lake Forest IL, USA) e Injeção de Heparina Sódio, USP (APP Pharmaceuticals, LLC, Schaumburg, IL, USA) foram usados.

[0103] Determinação de resposta cardiovascular. Os animais foram anestesiados com uretano dissolvido em salina isotônica. Uretano foi administrado em uma dose de 1,5 g por kg de peso corporal via injeção intraperitoneal. Uretano foi selecionado como um agente anestésico porque ele produz anestesia de longa duração (8-10 horas) com depressão mínima do sistema cardiovascular e respiratório. Ele produz um nível de anestesia cirúrgica caracterizado por preservação de reflexos cardiovasculares (Maggi e Meli 1986). Resumidamente, ratos anestesiados foram imobilizados em uma placa cirúrgica equipada com almofada de aquecimento controlada. As Po_2, Pco_2 e pH foram mantidas usando uma cânula de traqueotomia conectada a um ventilador de roedor (Modelo 683, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA). MAP e HR foram medidos canulando a artéria femoral esquerda com cateter de pressão SPR-320 (Millar Instruments), conectado ao amplificador de ponte ML221 (AD Instruments) através de conector AEC-10C e os sinais foram adquiridos (1000 S^{-1}) usando o sistema de aquisição de dados PowerLab

16/30(Gulati *et al.* 2012; Pacher *et al.* 2008). Uma sonda de fluxo Doppler a laser Perimed foi colocada na medula renal para medir perfusão sanguínea e os dados foram capturados em sistema de aquisição de dados PowerLab 16/30.. A veia femoral esquerda foi canulada usando tubulação PE 50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) efixada para ressuscitação.

[0104] Determinação de gases de sangue arterial e déficit de base. pH do sangue arterial de linha de base, Po_2, Pco_2, Na^+, K^+ e lactato foram monitorados antes da indução de choque, 30 minutos após indução de choque e 30 e 60 minutos após ressuscitação com veículo ou centaquina. Amostras de sangue (0,15 ml) foram retiradas da cânula arterial usando seringas de amostragem de gás sanguíneo (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) e analisadas usando um analisador pHOx Ultra (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). O déficit de base foi calculado usando a fórmula (Davis *et al.* 1998;Paladino *et al.* 2008):

$SBD=0,9287 \times [HCO_3^- - 24,4 + 14,83 \times (pH-7,4)]$

[0105] Indução de Choque Hemorrágico. Hemorragia foi induzida retirando sangue da artéria femoral a uma taxa de aproximadamente 0,5 a 1 mL/min. até que uma MAP de 35 mmHg fosse atingida. Esta MAP foi mantida por 30 minutos por retirada adicional de sangue, se necessário. O modelo de choque hemorrágico usado no presente estudo é um modelo de roedor bem estabelecido de hemorragia de pressão administrável (Buehler et al. 2000; Gulati et al. 1997; Gulati e Sen 1998). O volume de perda de sangue foi de aproximadamente 8,0 ml em cada rato e foi semelhante em vários grupos, chegando a aproximadamente 40% do sangue total. Níveis de hematócritos medidos foram semelhantes em vários grupos. A duração da retirada de sangue foi de aproximadamente 15 minutos.

[0106] Desenho experimental. Para determinar o efeito de ressuscitação de centaquina no sistema cardiovascular em choque hemorrágico, os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: ratos hemorragidos foram administrados com 100% do volume de sangue derramado de qualquer de

salina normal (veículo); 100% do volume de sangue derramado de qualquer salina normal mais centaquina (0,01 mg/kg) ou 100% do volume de sangue derramado de qualquer salina normal mais centaquina (0,10 mg/kg) durante os primeiros 10 minutos de ressuscitação. Experimentos adicionais também foram realizados onde a quantidade de norepinefrina (um vasopressor muito comumente usado durante ressuscitação) necessária para manter MAP em 70 mmHg em salina normal (NS) ou centaquina (0,01 mg/kg) em ratos tratados (volume igual à perda de sangue) foi determinada.

[0107] **Análise Estatística**. Uma Análise de Potência foi conduzida usando GraphPad Instat-2.00. A potência foi ajustada para 80% (beta = 0,8) e o nível de significância (alfa) utilizado foi de 0,05. Análise de Potência indicou que um tamanho de amostra de 5 para estimativa cardiovascular e 4 para estimativa bioquímica por grupo foi suficiente para atingir uma potência de 80%, quando nível de significância alfa=0,05. Dados são apresentados como média ± S.E.M. A significância de diferenças foi estimada por uma análise de variância unilateral seguida por um teste post hoc (método de Bonferroni). Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado ser significativo. A análise estatística foi processada com GraphPad Prism 7.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Resultados

[0108] **Efeito de centaquina em pH do sangue arterial, pO_2, pCO_2, hematócrito, lactato sanguíneo e déficit de base de ratos hemorragidos**. Uma redução significativa no pH sanguíneo foi observada em ratos em seguida a hemorragia, a qual foi diminuída ainda em seguida a administração de salina. A administração de centaquina (0,01 e 0,10 mg/kg) preveniu significativamente a redução de pH em ratos hemorragidos. Hemorragia produziu uma diminuição significativa em pCO_2 e aumento em pO_2 que não foram afetados por ressuscitação com salina ou centaquina.

[0109] Não houve nenhuma mudança na porcentagem de hematócrito em ratos de controle durante todo o período experimental, enquanto o hematócrito baixou significativamente após hemorragia. Ratos hemorragidos, quando

ressuscitados com salina ou com centaquina, não mostraram nenhuma mudança em hematócrito após tratamento.

[0110] Não houve nenhuma mudança em níveis de lactato no sangue em ratos de controle durante todo o período experimental, enquanto níveis de lactato foram aumentados significativamente em seguida a hemorragia. Ratos hemorragidos, quando ressuscitados com centaquina, mostraram uma diminuição em níveis de lactato no sangue em comparação com o grupo de salina.

[0111] Efeito da centaquina em pressão arterial média (MAP) de ratos hemorragidos. Ratos de controle não mostraram qualquer mudança em MAP durante o período experimental. MAP diminuiu significativamente em todos os grupos de tratamento após indução de hemorragia. Ratos hemorragidos, ressuscitados com salina, mostraram apenas melhora transiente em MAP pós-ressuscitação. Ratos ressuscitados com centaquina (0,01 e 0,10 mg/kg) mostraram um aumento significativo ($p<0,01$) em MAP pós-ressuscitação.

[0112] Efeito da centaquina em perfusão sanguínea renal de ratos hemorragidos. Ratos hemorragidos foram ressuscitados com veículo (salina) ou centaquina em dose baixa (0,01 mg/kg) ou dose alta (0,1 mg/kg). O efeito da centaquina em perfusão sanguínea renal foi medido antes da indução do choque, 30 minutos após o choque (hemorragia) e 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após ressuscitação. Baixas doses de centaquina melhoraram significativamente a perfusão sanguínea renal de ratos machos hemorragidos em comparação com igual volume de salina. Essa perfusão sanguínea medular renal melhorada é indicativa de um uso de centaquina para prevenir ou tratar lesões aos rins (Figura 5). Centaquina melhorou significativamente a perfusão sanguínea renal de ratos fêmeas hemorragidos em comparação com igual volume de salina (Figura 6). Uma dose baixa de 0,02 mg/kg de centaquina também foi considerada eficaz no aumento do fluxo sanguíneo renal de ratos hemorragidos submetidos a 20 minutos de oclusão da artéria renal. Uma dose dez vezes mais alta de 0,2 mg/kg de centaquinanão teve a

mesma eficácia no aumento do fluxo sanguíneo renal que uma dose baixa de 0,02 mg/kg de centaquina. Portanto, uma dose baixa (0,02 mg/kg) de centaquina foi mais eficaz que uma dose alta (0,2 mg/kg) de centaquina na melhora do fluxo sanguíneo renal de ratos hemorragidos submetidos a 20 minutos de oclusão da artéria renal.

[0113] Ratos machos foram anestesiados com uretano. A veia femoral foi canulada para administração de droga, a artéria femoral foi canulada para medir pressão arterial média (MAP) e uma sonda de fluxo Doppler a laser foi colocada na medula renal para medir a perfusão sanguínea. Indução de choque hemorrágico foi iniciada pela retirada de sangue para manter a MAP em 35 mmHg por 30 minutos. Infusão de norepinefrina foi realizada para trazer e manter a MAP em 70 mmHg. O efeito de centaquina em funções cardiovasculares foi medido antes da indução de choque, 30 minutos após choque (hemorragia) e 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após ressuscitação. Centaquina melhorou perfusão sanguínea renal de ratos machos hemorragidos em comparação com controle de veículo em seguida a ressuscitação. Os efeitos adversos de vasoconstrição induzida por norepinefrina podem ser atenuados por centaquina (FIgura 7). De modo similar, centaquina melhorou perfusão sanguínea renal de ratos fêmeas hemorragidos em comparação com controle de veículo em seguida a ressuscitação e uma perfusão sanguínea melhorada foi observada até o final do experimento (Figura 8). Os efeitos adversos de vasoconstrição induzida por norepinefrina podem ser atenuados por centaquina.

Exemplo 3

[0114] Um estudo de fase II prospectivo, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, paralelo controlado com salina de PMZ-2010 (centaquina) como um agente ressuscitador para choque hipovolêmico devido à perda excessiva de sangue (CTRI/2017/03/008184) está sendo conduzido. Todos os sujeitos receberam tratamento padrão para choque (o tipo de tratamento e os cuidados que a instituição inscrita forneceria). Os pacientes foram aleatoriamente

designados para qualquer uma da coorte de controle (N=7) que recebeu tratamento padrão junto com salina normal ou da coorte de PMZ-2010 (N=12) que recebeu tratamento padrão junto com PMZ-2010. A análise nesse ínterim mostrou dados demográficos comparáveis de pacientes em ambas as coortes (Tabela 2).

Tabela 2. Uma análise de ínterim mostrando dados demográficos comparáveis de pacientes em ambas as coortes do estudo de fase II.

Demografia de Paciente (Média ± SEM)						
Grupo	Gênero	Idade (Anos)	Peso Corporal (kg)	Altura (cm)	BMI (kg/m2)	BSA (m2)
Salina Normal (N=7)	(5M/2F)	37,00±6,41	64,29±5,01	167,86±2,24	22,96±1,24	1,74±0,07
PMZ-2010 (N=12)	(11M/1F)	41,08±3,59	65,42±3,88	166,50±2,57	23,46±0,99	1,73±0,06

[0115] A droga de investigação PMZ-2010 atingiu seu ponto extremo primário de segurança e nenhum evento adverso foi relatado. O número de doses necessárias em tratados com PMZ-2010 foi menor que o necessário na coorte de controle (Tabela 3). Do total de internações hospitalares, pacientes tratados com PMZ-2010 passaram apenas 39,3% do tempo na unidade de terapia intensiva em comparação com 57,3% do controle. O tempo gasto no ventilador foi de apenas 0,85 ± 0,71 dias em pacientes do grupo PMZ-2010, enquanto ele foi de 5,09 ± 3,14 dias nos pacientes do grupo de controle. O total de fluidos necessários nas primeiras 48 horas de ressuscitação foi de 19,9% menos em pacientes tratados com PMZ-2010; da mesma forma, o total de produtos derivados do sangue administrados nas primeiras 48 horas foi de 23,4% menor no grupo tratado com PMZ-2010 em comparação com o controle. A pressão arterial sistólica aumentou em 34,5% da linha de base (no momento da inclusão) até 48 horas após ressuscitação no grupo de controle, enquanto um aumento de 45,2% foi observado no grupo tratado com PMZ-2010 (Figura 9). Da mesma forma, a pressão arterial diastólica aumentou em 15,4% no grupo

de controle, enquanto 34,9% no grupo tratado com PMZ-2010 48 horas após ressuscitação (Figura 9). A quantidade total de vasopressores necessários nas primeiras 48 horas de ressuscitação foi de 18,4 ± 12,1 mg no grupo de controle, enquanto apenas de 1,3 ± 1,2 mg foram necessários em pacientes tratados com PMZ-2010. Os níveis de lactato no sangue diminuíram em 47% no controle e 63% em pacientes tratados com PMZ-2010. A análise nesse ínterim de um pequeno número de pacientes indicou que PMZ-2010 melhorou numerosos parâmetros que são indicativos de sua eficácia como agente de ressuscitação.

Tabela 3. Pacientes no estudo de fase II foram aleatoriamente designados para qualquer uma da coorte de controle (N=7) que recebeu tratamento padrão junto com salina normal ou da coorte de PMZ-2010 (N=12) que recebeu tratamento padrão junto com PMZ-2010. Uma análise nesse ínterim de acordo com o protocolo aprovado mostrou que o número de doses necessárias em tratados com PMZ-2010 foi menor que o necessário na coorte de controle. Embora estatisticamente não significativo, há uma tendência mostrando que a ressuscitação foi mais eficaz do que o tratamento padrão e exigiu cerca de 25% menos doses.

Número de Doses de Droga de Estudo Administradas nas Primeiras 48 horas (Média ± SEM)			
Grupo	Gênero	Número Total de doses administradas	Número de doses por paciente
Salina Normal (N=7)	(5M/2F)	10 doses em 7 pacientes	1,43±0,43
PMZ-2010 (N=12)	(11M/1F)	13 doses em 12 pacientes	1,08±0,08

[0116] Níveis de creatinina sérica foram determinados quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse ínterim de acordo com o protocolo aprovado mostrou que o nível de creatinina no soro diminuiu em 25,35% na coorte de controle e 42,61% em pacientes tratados com PMZ-2010. Os dados indicaram que a redução de níveis de creatinina sérica por PMZ-2010 é de 17,26% mais em comparação com o tratamento padrão. Ver Figura 10.

[0117] Nitrogênio de ureia no sangue foi determinado quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse interim conforme protocolo aprovado mostrou que o nitrogênio de uréia no sangue foi semelhante em coorte de controle e em pacientes tratados com PMZ-2010. Ver Figura 11.

[0118] Taxa de filtração flomerular foi determinada quando o paciente foi induzido no estudo (linha de base) e no tempo de alta do hospital (final do estudo). Uma análise nesse interim de acordo com o protocolo aprovado mostrou que a taxa de filtração glomerular aumentou em 40,00% em coorte de controle e em 81,52% em pacientes tratados com PMZ-2010. Os dados indicaram que um aumento em taxa de filtração glomerular por PMZ-2010 é de 41,52% mais em comparação com tratamento padrão. Veja a Figura 12.

Discussão

[0119] A principal característica da insuficiência renal aguda é um declínio abrupto na taxa de filtração glomerular (TFG), resultando na retenção de resíduos nitrogenados (ureia, creatinina). Na população mundial em geral 170-200 casos de insuficiência renal aguda severa por milhão de habitantes ocorrem anualmente. Até o momento, não há tratamento específico para insuficiência renal aguda. Várias drogas foram consideradas melhorar insuficiência renal aguda experimental tóxica e isquêmica, como manifestada por níveis mais baixos de creatinina sérica, dano histológico reduzido e recuperação mais rápida da função renal em diferentes modelos animais. Essas incluem antioxidantes, bloqueadores de canal de cálcio, diuréticos, substâncias vasoativas, fatores de crescimento, agentes anti-inflamatórios e mais. No entanto, essas drogas que foram estudadas em experimentos clínicos não mostraram nenhum benefício e seu uso em insuficiência renal aguda não foi aprovado. O exemplo anterior demonstra que uso de centaquina e seus sais para prevenir e/ou tratar pacientes com insuficiência renal aguda.

[0120] Centaquina demonstrou ter efeito ressuscitador significativo em seguida a hemorragia extensiva em modelos de ratos, coelhos e suínos.

Centaquina foi considerada ser um agente ressuscitador eficaz e induziu um aumento em fluxo sanguíneo para a medula renal e diminuição dos níveis de creatinina sérica em pacientes com choque hipovolêmico. Além disso, a centaquina aumentou a taxa de filtração glomerular em pacientes com choque hipovolêmico. É contemplado que centaquina e seus sais levarão a um efeito vasodilatador e promoverão diurese e natriurese, e melhorarão as funções renais aumentando a taxa de filtração glomerular e diminuirão os níveis de creatinina sérica.

REFERÊNCIAS

[0121] ACOSTA JA, YANG JC, WINCHELL RJ, SIMONS RK, FORTLAGE DA, HOLLINGSWORTH-FRIDLUND P and HOYT DB: Lethal injuries and time to death in a level I trauma center. Journal of the American College of Surgeons 186: 528-533, 1998.

[0122] ALLGREN RL, MARBURY TC, RAHMAN SN, WEISBERG LS, FENVES AZ, LAFAYETTE RA, SWEET RM, GENTER FC, KURNIK BR, CONGER JD and SAYEGH MH: Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *N Engl J Med* **336**: 828-834, 1997.

[0123] ALTEN JA, MORAN A, TSIMELZON AI, MASTRANGELO MA, HILSENBECK SG, POLI V and TWEARDY DJ: Prevention of hypovolemic circulatory collapse by IL-6 activated Stat3. PloS one 3: e1605, 2008.

[0124] ARAI H, HORI S, ARAMORI I, OHKUBO H and NAKANISHI S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature 348: 730-732, 1990.

[0125] ATREYA R, MUDTER J, FINOTTO S, MULLBERG J, JOSTOCK T, WIRTZ S, SCHUTZ M, BARTSCH B, HOLTMANN M, BECKER C, STRAND D, CZAJA J, SCHLAAK JF, LEHR HA, AUTSCHBACH F, SCHURMANN G, NISHIMOTO N, YOSHIZAKI K, ITO H, KISHIMOTO T, GALLE PR, ROSE-JOHN S and NEURATH MF: Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal

inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nature medicine 6: 583-588, 2000.

[0126] BALOGH Z, MCKINLEY BA, HOLCOMB JB, MILLER CC, COCANOUR CS, KOZAR RA, VALDIVIA A, WARE DN and MOORE FA: Both primary and secondary abdominal compartment syndrome can be predicted early and are harbingers of multiple organ failure. *The Journal of trauma* **54**: 848-859; discussion 859-861, 2003.

[0127] BAUER M, BAUER I, SONIN NV, KRESGE N, BAVEJA R, YOKOYAMA Y, HARDING D, ZHANG JX and CLEMENS MG: Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hepatology* **31**: 937-947, 2000.

[0128] BHATNAGAR M, PANDE M, DUBEY MP and DHAWAN BN: Effect of centhaquine on spontaneous and evoked norepinephrine release from isolated perfused rabbit heart. *Arzneimittelforschung* **35**: 693-697, 1985.

[0129] BONANNO FG: Physiopathology of shock. Journal of emergencies, trauma, and shock 4: 222-232, 2011.

[0130] BOURQUE SL, DAVIDGE ST and ADAMS MA: The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 300: R1288-1295, 2011.

[0131] BREUILLER-FOUCHE M, MORINIERE C, DALLOT E, OGER S, REBOURCET R, CABROL D and LEROY MJ: Regulation of the endothelin/endothelin receptor system by interleukin-1{beta} in human myometrial cells. Endocrinology 146: 4878-4886, 2005.

[0132] BRIYAL S, NGUYEN C, LEONARD M and GULATI A (2015) Stimulation of endothelin B receptors by IRL-1620 decreases the progression of Alzheimer's disease, in Neuroscience pp 1-11.

[0133] BRUCE AJ, BOLING W, KINDY MS, PESCHON J, KRAEMER PJ, CARPENTER MK, HOLTSBERG FW and MATTSON MP: Altered neuronal and

microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. Nature medicine 2: 788-794, 1996.

[0134] BUEHLER PW, MEHENDALE S, WANG H, XIE J, MA L, TRIMBLE CE, HSIA CJ and GULATI A: Resuscitative effects of polynitroxylated alphaalpha-cross-linked hemoglobin following severe hemorrhage in the rat. Free radical biology & medicine 29: 764-774, 2000.

[0135] CARDILLO C, KILCOYNE CM, CANNON RO, 3RD and PANZA JA: Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. Hypertension 35: 1237-1241, 2000.

[0136] CHANG H, WU GJ, WANG SM and HUNG CR: Plasma endothelin level changes during hemorrhagic shock. The Journal of trauma 35: 825-833, 1993.

[0137] CHAUDRY IH, AYALA A, ERTEL W and STEPHAN RN: Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. The American journal of physiology 259: R663-678, 1990.

[0138] COWLEY AW, JR.: Renal medullary oxidative stress, pressure-natriuresis, and hypertension. Hypertension 52: 777-786, 2008.

[0139] DAVIS JW, KAUPS KL and PARKS SN: Base deficit is superior to pH in evaluating clearance of acidosis after traumatic shock. The Journal of trauma 44: 114-118, 1998.

[0140] EDWARDS JD, DOVGAN PS, ROWLEY JM, AGRAWAL DK, THORPE PE and ADRIAN TE: Endothelin-1 levels in ischaemia, reperfusion, and haemorrhagic shock in the canine infrarenal aortic revascularisation model. European journal of vascular surgery 8: 729-734, 1994.

[0141] EHRENREICH H, NAU TR, DEMBOWSKI C, HASSELBLATT M, BARTH M, HAHN A, SCHILLING L, SIREN AL and BRUCK W: Endothelin b receptor deficiency is associated with an increased rate of neuronal apoptosis in the dentate gyrus. *Neuroscience* **95**: 993-1001, 2000.

[0142] FELLNER SK and ARENDSHORST W: Endothelin-A and -B receptors, superoxide, and Ca2+ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F175-184, 2007.

[0143] FONTANILLA CV, FAUNCE DE, GREGORY MS, MESSINGHAM KA, DURBIN EA, DUFFNER LA and KOVACS EJ: Anti-interleukin-6 antibody treatment restores cell-mediated immune function in mice with acute ethanol exposure before burn trauma. Alcoholism, clinical and experimental research 24: 1392-1399, 2000.

[0144] FUHRMAN DY, KANE-GILL S, GOLDSTEIN SL, PRIYANKA P and KELLUM JA: Acute kidney injury epidemiology, risk factors, and outcomes in critically ill patients 16-25 years of age treated in an adult intensive care unit. *Ann Intensive Care* **8**: 26, 2018.

[0145] GADIENT RA, CRON KC and OTTEN U: Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. Neuroscience letters 117: 335-340, 1990.

[0146] GADO K, DOMJAN G, HEGYESI H and FALUS A: Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. Cell biology international 24: 195-209, 2000.

[0147] GARDINER SM, KEMP PA, MARCH JE and BENNETT T: Effects of bosentan (Ro 47-0203), an ETA-, ETB-receptor antagonist, on regional haemodynamic responses to endothelins in conscious rats. British journal of pharmacology 112: 823-830, 1994.

[0148] GOTO K, KASUYA Y, MATSUKI N, TAKUWA Y, KURIHARA H, ISHIKAWA T, KIMURA S, YANAGISAWA M and MASAKI T: Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca2+ channel in vascular smooth muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 3915-3918, 1989.

[0149] GULATI A, BRIYAL S, GANDHAKWALA R, KHAN M and LAVHALE M: Effect of centhaquin on endothelin receptors following resuscitation of hemorrhaged rat. *Critical Care Medicine* **44**: 163, 2016a.

[0150] GULATI A, BRIYAL S, LAVHALE MS, GANDHAKWALA R and KHAN M: Endothelin Receptor Alteration Following Hemorrhagic Shock and Resuscitation by Centhaquin. *Circulation* **136**: A20622, 2017.

[0151] GULATI A: Evidence for antagonistic activity of endothelin for clonidine induced hypotension and bradycardia. Life Sci 50: 153-160, 1992.

[0152] GULATI A, GOYAL AO, LAVHALE MS, GULATI S and SCHEETZ M: Human Pharmacokinetics of Centhaquin Citrate, a Novel Resuscitative Agent. *Circulation* **134 (Suppl 1)**: A16607-A16607, 2016.

[0153] GULATI A, LAVHALE MS, GARCIA DJ and HAVALAD S: Centhaquin improves resuscitative effect of hypertonic saline in hemorrhaged rats. The Journal of surgical research 178: 415-423, 2012.

[0154] GULATI A, REBELLO S and KUMAR A: Role of sympathetic nervous system in cardiovascular effects of centrally administered endothelin-1 in rats. The American journal of physiology 273: H1177-1186, 1997a.

[0155] GULATI A and SEN AP: Dose-dependent effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. Shock 9: 65-73, 1998.

[0156] GULATI A, SEN AP, SHARMA AC and SINGH G: Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. The American journal of physiology 273: H827-836, 1997b.

[0157] GULATI A, SINGH R, CHUNG SM and SEN AP: Role of endothelin-converting enzyme in the systemic hemodynamics and regional circulatory effects of proendothelin-1 (1-38) and diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. J Lab Clin Med 126: 559-570, 1995.

[0158] GULATI A and SRIMAL RC: Endothelin antagonizes the hypotension and potentiates the hypertension induced by clonidine. European journal of pharmacology 230: 293-300, 1993.

[0159] GULATI A, ZHANG Z, MURPHY A and LAVHALE MS: Efficacy of centhaquin as a small volume resuscitative agent in severely hemorrhaged rats. Am J Emerg Med 31: 1315-1321, 2013.

[0160] GUTIERREZ G, REINES HD and WULF-GUTIERREZ ME: Clinical review: hemorrhagic shock. Critical care 8: 373-381, 2004.

[0161] HAMA T, MIYAMOTO M, TSUKUI H, NISHIO C and HATANAKA H: Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. Neuroscience letters 104: 340-344, 1989.

[0162] HARRIS PJ, ZHUO J, MENDELSOHN FA and SKINNER SL: Haemodynamic and renal tubular effects of low doses of endothelin in anaesthetized rats. The Journal of physiology 433: 25-39, 1991.

[0163] HELMY A, JALAN R, NEWBY DE, JOHNSTON NR, HAYES PC and WEBB DJ: Altered peripheral vascular responses to exogenous and endogenous endothelin-1 in patients with well-compensated cirrhosis. Hepatology 33: 826-831, 2001.

[0164] HERCULE HC and OYEKAN AO: Cytochrome P450 omega/omega-1 hydroxylase-derived eicosanoids contribute to endothelin(A) and endothelin(B) receptor-mediated vasoconstriction to endothelin-1 in the rat preglomerular arteriole. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 292: 1153-1160, 2000.

[0165] HIRSCHBERG R, KOPPLE J, LIPSETT P, BENJAMIN E, MINEI J, ALBERTSON T, MUNGER M, METZLER M, ZALOGA G, MURRAY M, LOWRY S, CONGER J, MCKEOWN W, O'SHEA M, BAUGHMAN R, WOOD K, HAUPT M, KAISER R, SIMMS H, WARNOCK D, SUMMER W, HINTZ R, MYERS B, HAENFTLING K, CAPRA W and ET AL.: Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. *Kidney Int* **55**: 2423-2432, 1999.

[0166] HOFFMAN A, ABASSI ZA, BRODSKY S, RAMADAN R and WINAVER J: Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis : role of ET(B) receptors. Hypertension 35: 732-739, 2000.

[0167] INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KASUYA Y, MIYAUCHI T, GOTO K and MASAKI T: The human endothelin family: three structurally and

pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2863-2867, 1989.

[0168] JACOB M and KUMAR P: The challenge in management of hemorrhagic shock in trauma. Medical journal, Armed Forces India 70: 163-169, 2014.

[0169] JOCHEM J, ZWIRSKA-KORCZALA K, GWOZDZ B, WALICHIEWICZ P and JOSKO J: Cardiac and regional haemodynamic effects of endothelin-1 in rats subjected to critical haemorrhagic hypotension. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society 54: 383-396, 2003.

[0170] KIM JY, KAWABORI M and YENARI MA: Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. Current medicinal chemistry 21: 2076-2097, 2014.

[0171] KITAMURA K, TANAKA T, KATO J, OGAWA T, ETO T and TANAKA K: Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats. Biochemical and biophysical research communications 162: 38-44, 1989.

[0172] KOHAN DE, ROSSI NF, INSCHO EW and POLLOCK DM: Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. Physiological reviews 91: 1-77, 2011.

[0173] KOMAROV PG, KOMAROVA EA, KONDRATOV RV, CHRISTOV-TSELKOV K, COON JS, CHERNOV MV and GUDKOV AV: A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**: 1733-1737, 1999.

[0174] KON V, YOSHIOKA T, FOGO A and ICHIKAWA I: Glomerular actions of endothelin in vivo. The Journal of clinical investigation 83: 1762-1767, 1989.

[0175] KOSSMANN T, HANS V, IMHOF HG, TRENTZ O and MORGANTI-KOSSMANN MC: Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. Brain research 713: 143-152, 1996.

[0176] KOWALCZYK A, KLENIEWSKA P, KOLODZIEJCZYK M, SKIBSKA B and GORACA A: The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis 63: 41-52, 2015.

[0177] LAVHALE MS, BRIYAL S, PARIKH N and GULATI A: Endothelin modulates the cardiovascular effects of clonidine in the rat. Pharmacological research 62: 489-499, 2010.

[0178] LAVHALE MS, HAVALAD S and GULATI A: Resuscitative effect of centhaquin after hemorrhagic shock in rats. The Journal of surgical research 179: 115-124, 2013.

[0179] LAWRENCE E, SINEY L, WILSONCROFT P, KNOCK GA, TERENGHI G, POLAK JM and BRAIN SD: Evidence for ETA and ETB receptors in rat skin and an investigation of their function in the cutaneous microvasculature. *Br J Pharmacol* **115**: 840-844, 1995.

[0180] LEONARD MG and GULATI A: Endothelin B receptor agonist, IRL-1620, enhances angiogenesis and neurogenesis following cerebral ischemia in rats. Brain research 1528: 28-41, 2013.

[0181] LIANGOS O, WALD R, O'BELL JW, PRICE L, PEREIRA BJ and JABER BL: Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* **1**: 43-51, 2006.

[0182] LODGE NJ, ZHANG R, HALAKA NN and MORELAND S: Functional role of endothelin ETA and ETB receptors in venous and arterial smooth muscle. European journal of pharmacology 287: 279-285, 1995.

[0183] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL and RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry 193: 265-275, 1951.

[0184] MAGGI CA and MELI A: Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. Experientia 42: 292-297, 1986.

[0185] MARIK PE and FLEMMER M: The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. The journal of trauma and acute care surgery 73: 801-808, 2012.

[0186] MATHISON Y and ISRAEL A: Endothelin ET(B) receptor subtype mediates nitric oxide/cGMP formation in rat adrenal medulla. *Brain Res Bull* **45**: 15-19, 1998.

[0187] MAZZONI MR, BRESCHI MC, CECCARELLI F, LAZZERI N, GIUSTI L, NIERI P and LUCACCHINI A: Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1 (8-21), IRL 1620, identifies two populations of ET(B) receptors in guinea-pig bronchus. *Br J Pharmacol* **127**: 1406-1414, 1999.

[0188] MEES ST, TOELLNER S, MARX K, FAENDRICH F, KALLEN KJ, SCHROEDER J, HAIER J and KAHLKE V: Inhibition of interleukin-6-transsignaling via gp130-Fc in hemorrhagic shock and sepsis. The Journal of surgical research 157: 235-242, 2009.

[0189] MENG ZH, DYER K, BILLIAR TR and TWEARDY DJ: Distinct effects of systemic infusion of G-CSF vs. IL-6 on lung and liver inflammation and injury in hemorrhagic shock. Shock 14: 41-48, 2000.

[0190] MICKLEY EJ, GRAY GA and WEBB DJ: Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. British journal of pharmacology 120: 1376-1382, 1997.

[0191] MOMMSEN P, BARKHAUSEN T, FRINK M, ZECKEY C, PROBST C, KRETTEK C and HILDEBRAND F: Productive capacity of alveolar macrophages and pulmonary organ damage after femoral fracture and hemorrhage in IL-6 knockout mice. Cytokine 53: 60-65, 2011.

[0192] MORAN A, TSIMELZON AI, MASTRANGELO MA, WU Y, YU B, HILSENBECK SG, POLI V and TWEARDY DJ: Prevention of trauma/hemorrhagic shock-induced lung apoptosis by IL-6-mediated activation of Stat3. Clinical and translational science 2: 41-49, 2009.

[0193] NAMAS R, GHUMA A, TORRES A, POLANCO P, GOMEZ H, BARCLAY D, GORDON L, ZENKER S, KIM HK, HERMUS L, ZAMORA R, ROSENGART MR, CLERMONT G, PEITZMAN A, BILLIAR TR, OCHOA J, PINSKY MR, PUYANA JC and VODOVOTZ Y: An adequately robust early TNF-alpha response is a hallmark of survival following trauma/hemorrhage. PloS one 4: e8406, 2009.

[0194] O'DONNELL JN, GULATI A, LAVHALE MS, SHARMA SS, PATEL AJ, RHODES NJ and SCHEETZ MH: Pharmacokinetics of centhaquin citrate in a rat model. *J Pharm Pharmacol* **68**: 56-62, 2016a.

[0195] O'DONNELL JN, O'DONNELL EP, KUMAR EJ, LAVHALE MS, ANDURKAR SV, GULATI A and SCHEETZ MH: Pharmacokinetics of centhaquin citrate in a dog model. *J Pharm Pharmacol* **68**: 803-809, 2016b.

[0196] OBERHOLZER A, OBERHOLZER C and MOLDAWER LL: Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. Critical care medicine 28: N3-12, 2000.

[0197] PACHER P, NAGAYAMA T, MUKHOPADHYAY P, BATKAI S and KASS DA: Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. Nature protocols 3: 1422-1434, 2008.

[0198] PALADINO L, SINERT R, WALLACE D, ANDERSON T, YADAV K and ZEHTABCHI S: The utility of base deficit and arterial lactate in differentiating major from minor injury in trauma patients with normal vital signs. Resuscitation 77: 363-368, 2008.

[0199] PAPALEXOPOULOU K, CHALKIAS A, PLIATSIKA P, PAPALOIS A, PAPAPANAGIOTOU P, PAPADOPOULOS G, ARNAOUTOGLOU E, PETROU A, GULATI A and XANTHOS T: Centhaquin Effects in a Swine Model of Ventricular Fibrillation: Centhaquin and Cardiac Arrest. *Heart, Lung and Circulation* **26**: 856-863, 2017.

[0200] PAPAPANAGIOTOU P, XANTHOS T, GULATI A, CHALKIAS A, PAPALOIS A, KONTOULI Z, ALEGAKIS A and IACOVIDOU N: Centhaquin

improves survival in a swine model of hemorrhagic shock. The Journal of surgical research 200: 227-235, 2016.

[0201] PEAKE NJ, KHAWAJA K, MYERS A, NOWELL MA, JONES SA, ROWAN AD, CAWSTON TE and FOSTER HE: Interleukin-6 signalling in juvenile idiopathic arthritis is limited by proteolytically cleaved soluble interleukin-6 receptor. Rheumatology 45: 1485-1489, 2006.

[0202] PERNOW J, BOHM F, JOHANSSON BL, HEDIN U and RYDEN L: Enhanced vasoconstrictor response to endothelin-B-receptor stimulation in patients with atherosclerosis. Journal of cardiovascular pharmacology 36: S418-420, 2000.

[0203] ROSSAINT R, CERNY V, COATS TJ, DURANTEAU J, FERNANDEZ-MONDEJAR E, GORDINI G, STAHEL PF, HUNT BJ, NEUGEBAUER E and SPAHN DR: Key issues in advanced bleeding care in trauma. Shock 26: 322-331, 2006.

[0204] SANCHEZ A, CONTRERAS C, MARTINEZ P, MUNOZ M, MARTINEZ AC, GARCIA-SACRISTAN A, HERNANDEZ M and PRIETO D: Endothelin A (ET(A)) receptors are involved in augmented adrenergic vasoconstriction and blunted nitric oxide-mediated relaxation of penile arteries from insulin-resistant obese zucker rats. J Sex Med 11: 1463-1474, 2014.

[0205] SANDOO A, VAN ZANTEN JJ, METSIOS GS, CARROLL D and KITAS GD: The endothelium and its role in regulating vascular tone. The open cardiovascular medicine journal 4: 302-312, 2010.

[0206] SCHNEIDER MP, BOESEN EI and POLLOCK DM: Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. Annual review of pharmacology and toxicology 47: 731-759, 2007.

[0207] SHACKFORD SR, MACKERSIE RC, HOLBROOK TL, DAVIS JW, HOLLINGSWORTH-FRIDLUND P, HOYT DB and WOLF PL: The epidemiology of traumatic death. A population-based analysis. Archives of surgery 128: 571-575, 1993.

[0208] SHARMA AC, SINGH G and GULATI A: Decompensation characterized by decreased perfusion of the heart and brain during hemorrhagic shock: role of endothelin-1. The Journal of trauma 53: 531-536, 2002.

[0209] SRIRAM K and O'CALLAGHAN JP: Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 2: 140-153, 2007.

[0210] SUPAVEKIN S, ZHANG W, KUCHERLAPATI R, KASKEL FJ, MOORE LC and DEVARAJAN P: Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* **63**: 1714-1724, 2003.

[0211] THAKALI K, GALLIGAN JJ, FINK GD, GARIEPY CE and WATTS SW: Pharmacological endothelin receptor interaction does not occur in veins from ET(B) receptor deficient rats. Vascul Pharmacol 49: 6-13, 2008.

[0212] VASSILEVA I, MOUNTAIN C and POLLOCK DM: Functional role of ETB receptors in the renal medulla. Hypertension 41: 1359-1363, 2003.

[0213] VIDOVIC M, CHEN MM, LU QY, KALLONIATIS KF, MARTIN BM, TAN AH, LYNCH C, CROAKER GD, CASS DT and SONG ZM: Deficiency in endothelin receptor B reduces proliferation of neuronal progenitors and increases apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Cell Mol Neurobiol* **28**: 1129-1138, 2008.

[0214] VINCENZI R, CEPEDA LA, PIRANI WM, SANNOMYIA P, ROCHA ESM and CRUZ RJ, JR.: Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg* **198**: 407-414, 2009.

[0215] VIRDIS A and SCHIFFRIN EL: Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? Current opinion in nephrology and hypertension 12: 181-187, 2003.

[0216] WHITE LR, JUUL R, SKAANES KO and AASLY J: Cytokine enhancement of endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. European journal of pharmacology 406: 117-122, 2000.

[0217] WU D, DAI H, ARIAS J, LATTA L and ABRAHAM WM: Low-volume resuscitation from traumatic hemorrhagic shock with Na+/H+ exchanger inhibitor. Critical care medicine 37: 1994-1999, 2009.

[0218] YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K and MASAKI T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332: 411-415, 1988.

[0219] YANG S, HU S, CHOUDHRY MA, RUE LW, 3RD, BLAND KI and CHAUDRY IH: Anti-rat soluble IL-6 receptor antibody down-regulates cardiac IL-6 and improves cardiac function following trauma-hemorrhage. Journal of molecular and cellular cardiology 42: 620-630, 2007.

[0220] YEAGER ME, BELCHENKO DD, NGUYEN CM, COLVIN KL, IVY DD and STENMARK KR: Endothelin-1, the unfolded protein response, and persistent inflammation: role of pulmonary artery smooth muscle cells. American journal of respiratory cell and molecular biology 46: 14-22, 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prevenir ou tratar lesão ou insuficiência renal administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agonista do receptor da endotelina B (ET_B) a um indivíduo em necessidade do mesmo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agonista do receptor de ET_B é selecionado do grupo que consiste em N-Succinil-[Glu^9, $Ala^{11,15}$] endotelina 1 (IRL-1620), BQ-3020, [$Ala^{1,3,11,15}$]-endotelina, sarafotoxina S6c e endotelina 3.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o agonista do receptor de ET_B é administrado em uma dose variando de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar doses múltiplas do agonista do receptor de ET_B.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a administração compreende uma dose única do agonista do receptor de ET_B.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de centaquina ou um sal do mesmo ao indivíduo.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a lesão ou insuficiência renal é aguda.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a insuficiência renal resulta de exposição a meios de radiocontraste, uma droga anti-inflamatório não esteroidal (NSAID), um antibiótico, um agente quimioterapêutico, nefrite tubulointersticial granulomatosa aguda induzida por nivolumabe ou um droga nefrotóxica.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a insuficiência renal aguda é causada por ou está associada a doença crítica, débito cardíaco reduzido, trauma, oxigenação sanguínea reduzida,

toxicidade sistêmica causada por reação a lesão em outro órgão, hipotensão sistêmica resultante de síndrome cardiorrenal, cirurgia cardíaca ou insuficiência cardíaca descompensada aguda, uma redução no volume circulante devido a hemorragia, choque séptico, choque hipovolêmico, dengue severa, um procedimento cirúrgico, rabdomiólise ou uma redução em fluxo sanguíneo renal local resultante de síndrome hepatorrenal ou transplante de fígado, ou desidratação causada por diarreia, vômito, diuréticos ou sudorese excessiva.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizado pelo fato de que a taxa de filtração glomerular renal do indivíduo é melhorada.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, caracterizado pelo fato de que o nível de creatinina sérica do indivíduo é reduzido.

12. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende (a) um agonista do receptor de endotelina B (ET_B), (b) centaquina ou um sal do mesmo e, opcionalmente, (c) um excipiente.

13. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) uma composição empacotada compreendendo um agonista do receptor da endotelina B (ET_B) e centacaquina ou um sal do mesmo;

(b) uma inserção fornecendo instruções para uma administração simultânea ou sequencial do agonista do receptor de ET_B e da centaquina ou sal do mesmo para tratar um paciente; e

(c) um recipiente para (a) e (b).

14. Artigo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o agonista do receptor da endotelina B é N-Succinil-[Glu^{9}, $Ala^{11,15}$] endotelina 1 (IRL-1620).

15. Método para tratar um indivíduo sofrendo de declínio de função renal agudo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo centaquina ou um sal do mesmo.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o declínio de função renal agudo está associado à insuficiência renal aguda.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a insuficiência renal aguda é causada por ou está associada a doença crítica, débito cardíaco reduzido, trauma, oxigenação sanguínea reduzida, toxicidade sistêmica causada por reação a lesão em outro órgão, hipotensão sistêmica resultante de síndrome cardiorrenal, cirurgia cardíaca ou insuficiência cardíaca descompensada aguda, uma redução no volume circulante devido a hemorragia, choque séptico, choque hipovolêmico, dengue severa, um procedimento cirúrgico, rabdomiólise ou uma redução em fluxo sanguíneo renal local resultante de síndrome hepatorrenal ou transplante de fígado, nefrotoxicidade resultante de drogas, meio de radiocontraste, uma droga anti-inflamatória não esteroidal (NSAID), um antibiótico, ou um agente quimioterapêutico, ou desidratação causada por diarreia, vômito, diuréticos ou sudorese excessiva.

18. Método para tratar um indivíduo sofrendo de lesão renal, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo centaquina ou um sal do mesmo.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a lesão renal resulta de um evento isquêmico ou um evento de reperfusão isquêmica.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 19, caracterizado pelo fato de que o sal é citrato, piruvato ou lactato.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 20, caracterizado pelo fato de que a centaquina ou sal do mesmo é administrado a uma dose de cerca de 0,0001 mg/kg a cerca de 1,0 mg/kg.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a centaquina ou sal do mesmo é administrado em doses simples ou múltiplas.

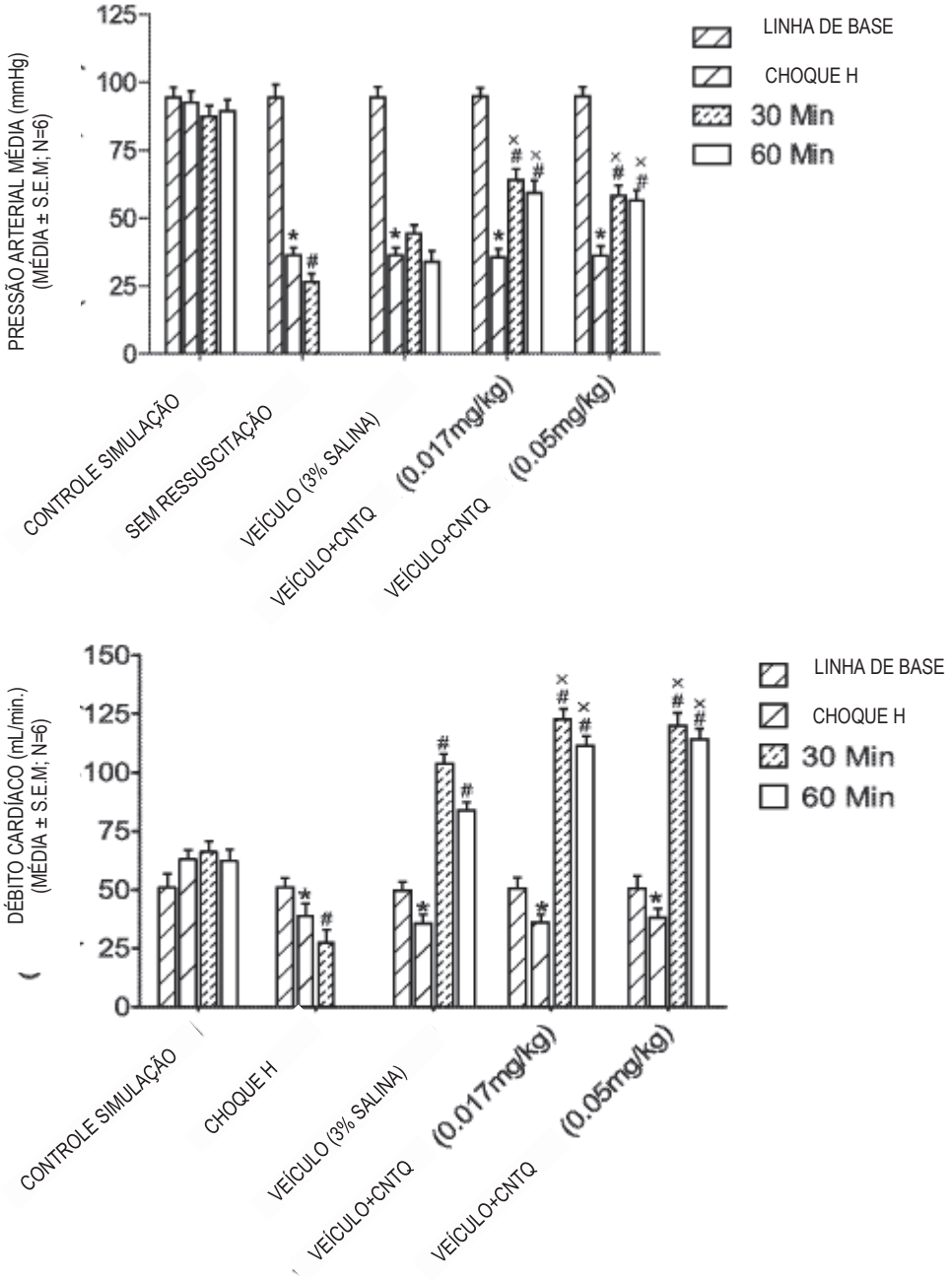


FIGURA 1
(CONTINUA)

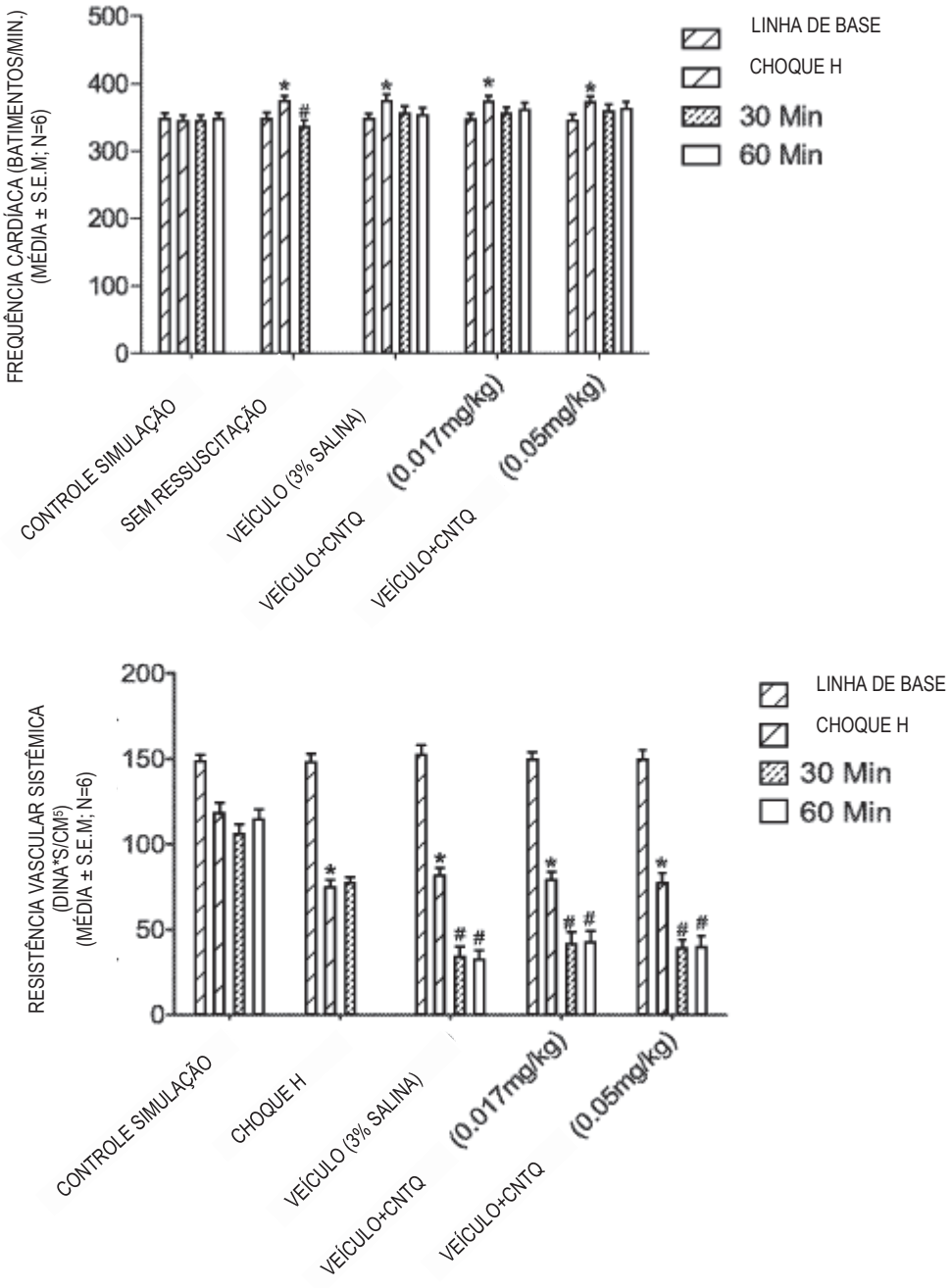


FIGURA 1
(CONTINUAÇÃO)

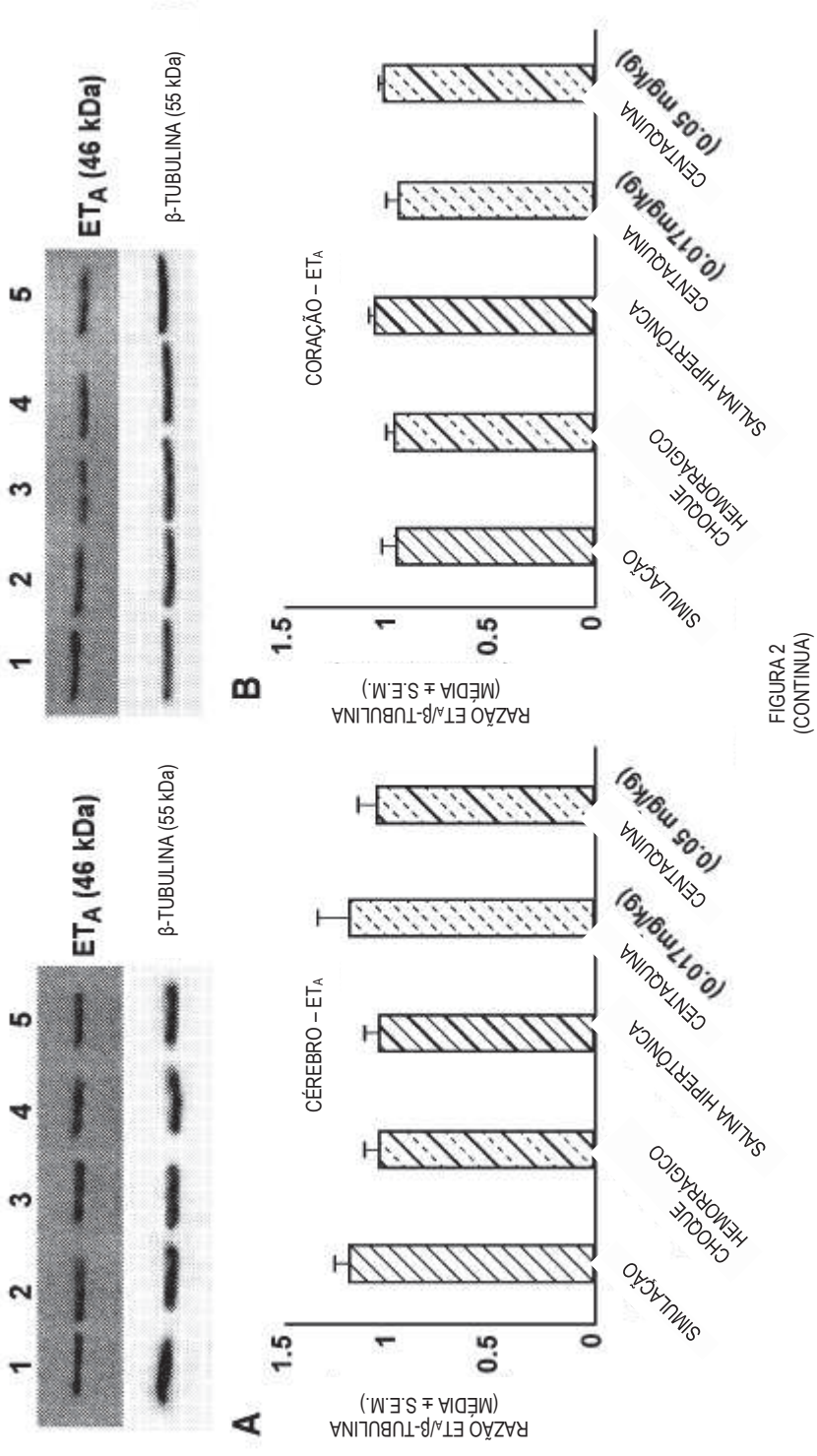


FIGURA 2
(CONTINUA)

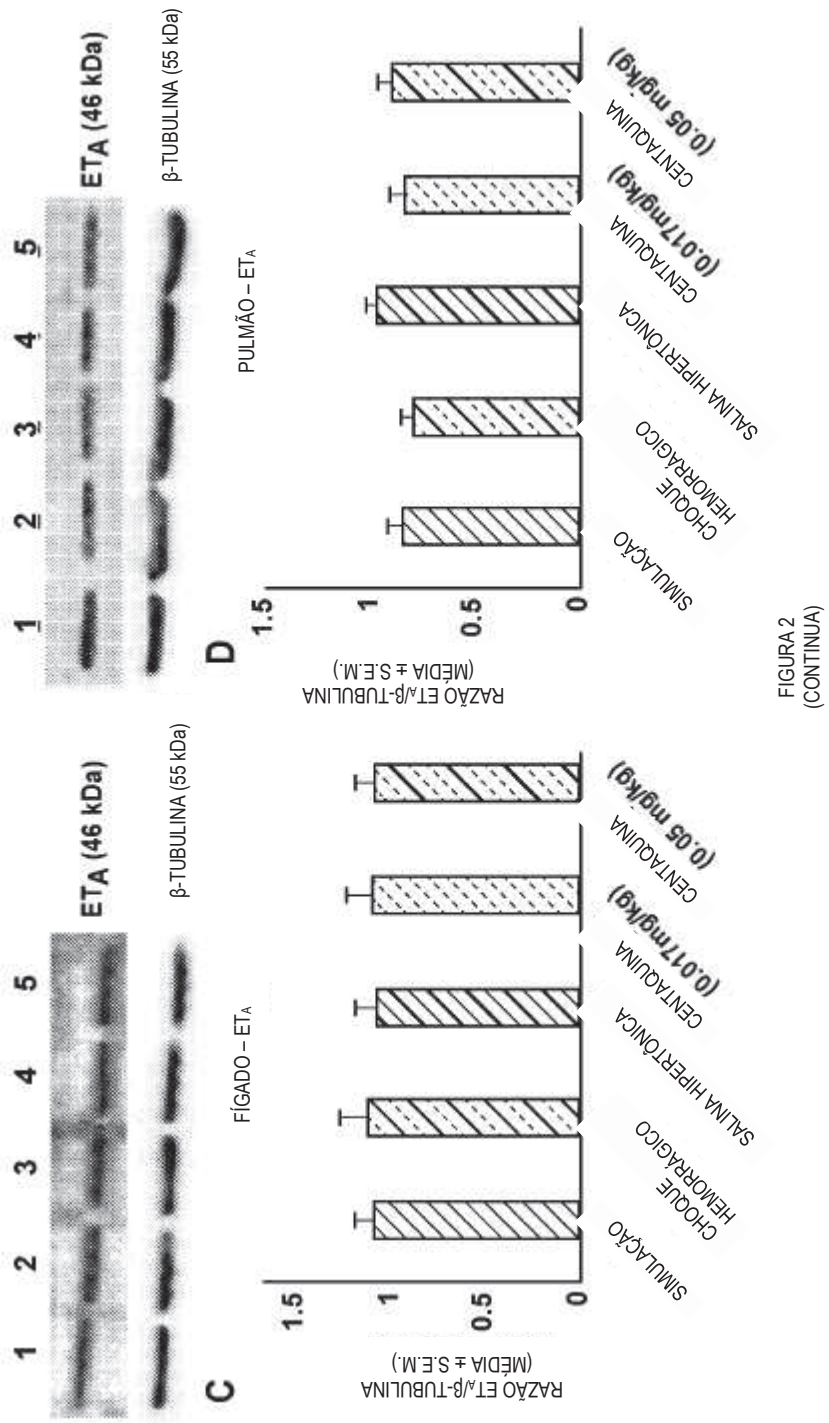


FIGURA 2
(CONTINUA)

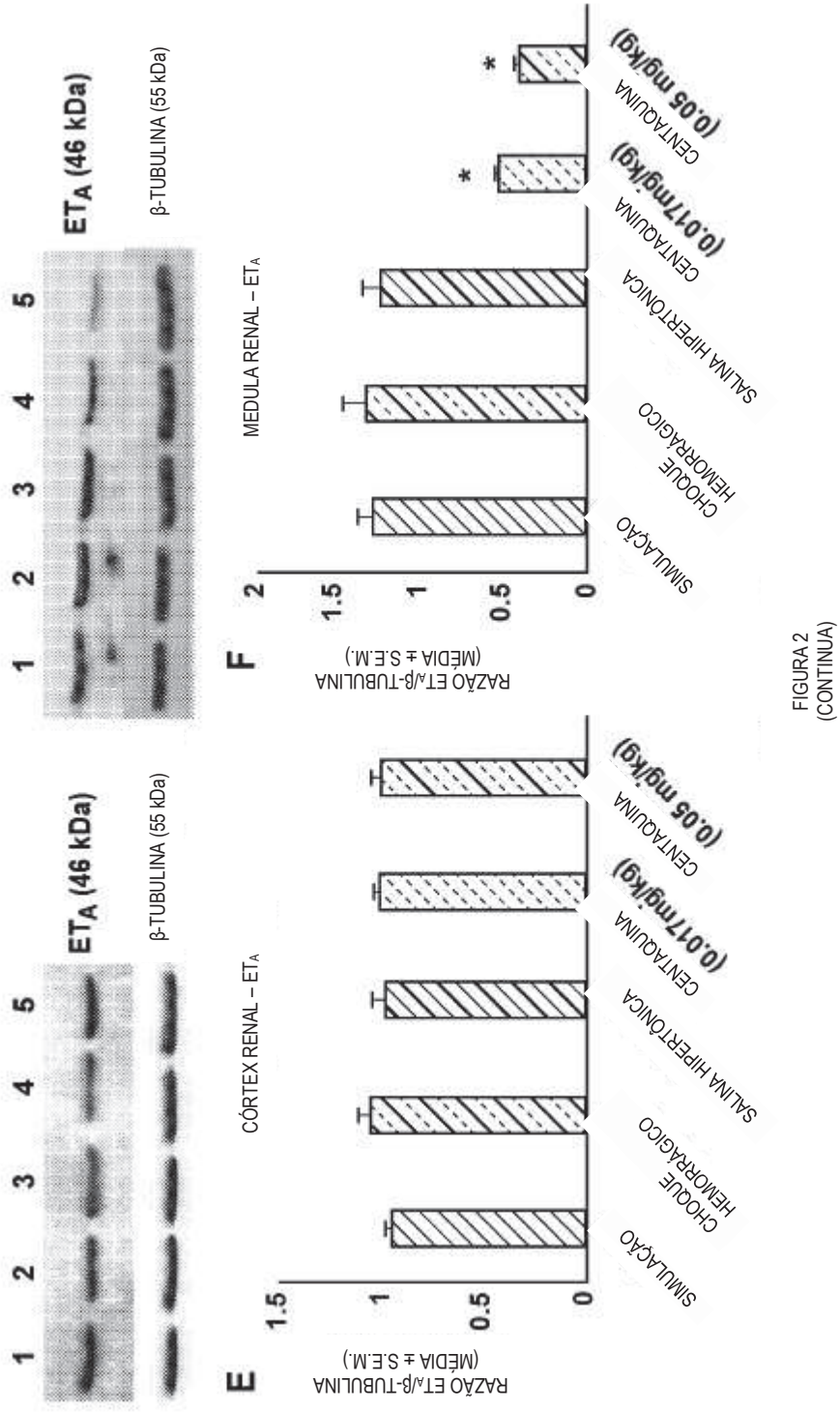


FIGURA 2
(CONTINUA)

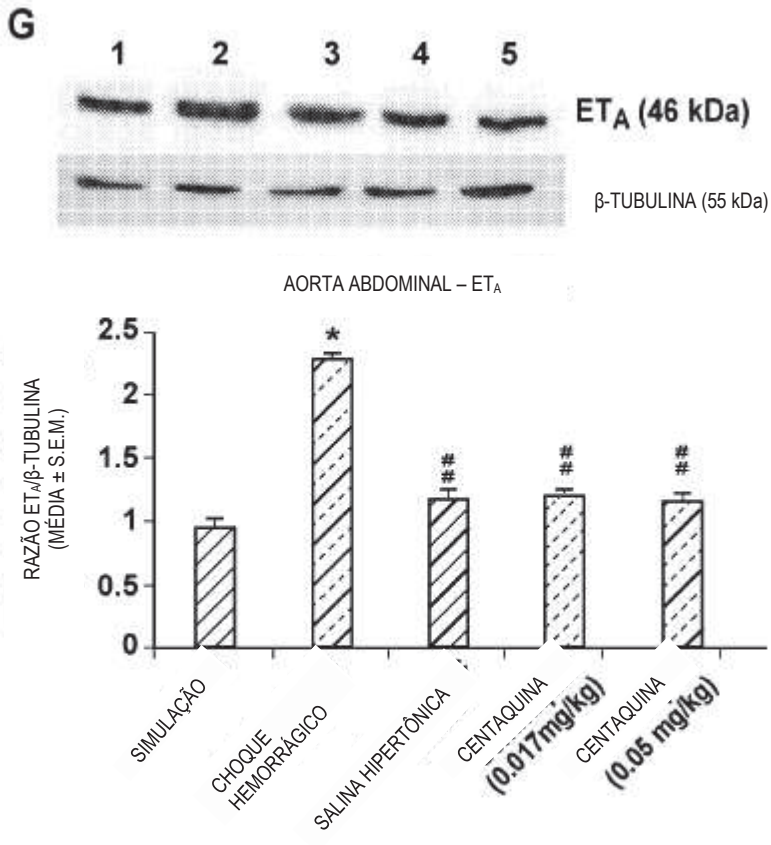


FIGURA 2
(CONTINUAÇÃO)

FIGURA 3
(CONTINUA)

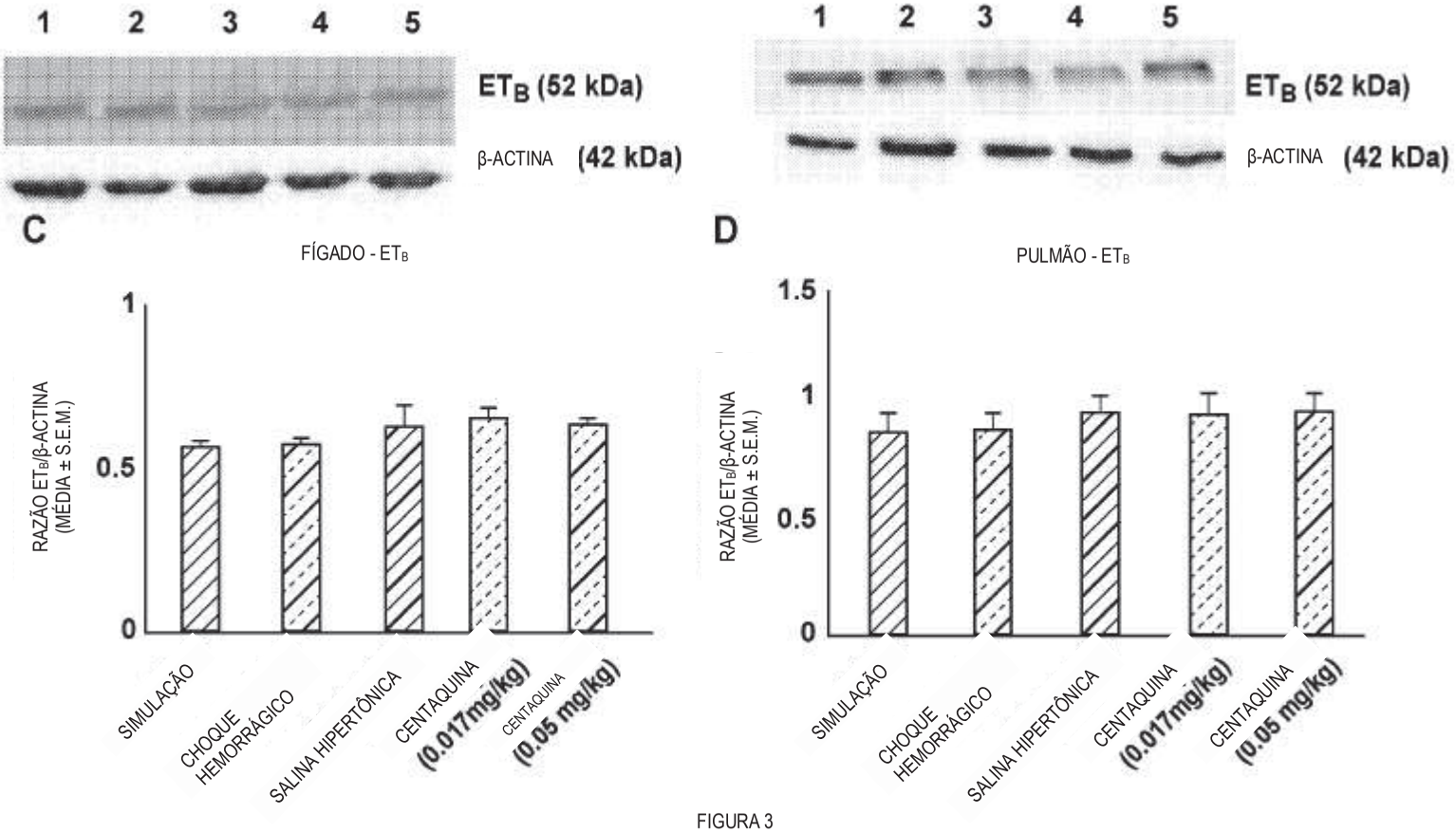


FIGURA 3
(CONTINUA)

Petição 870210030994, de 05/04/2021, pág. 18/97

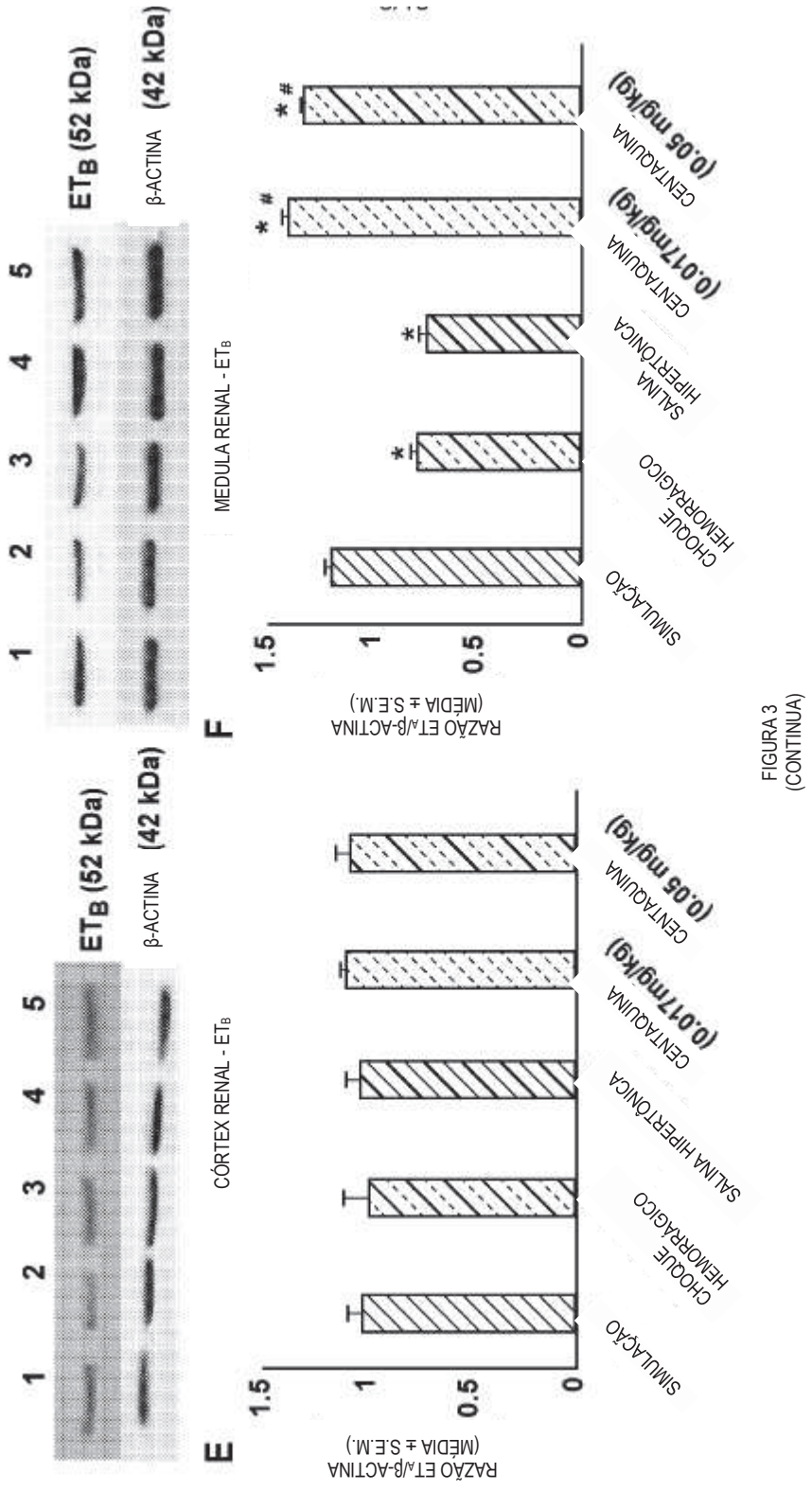


FIGURA 3
(CONTINUA)

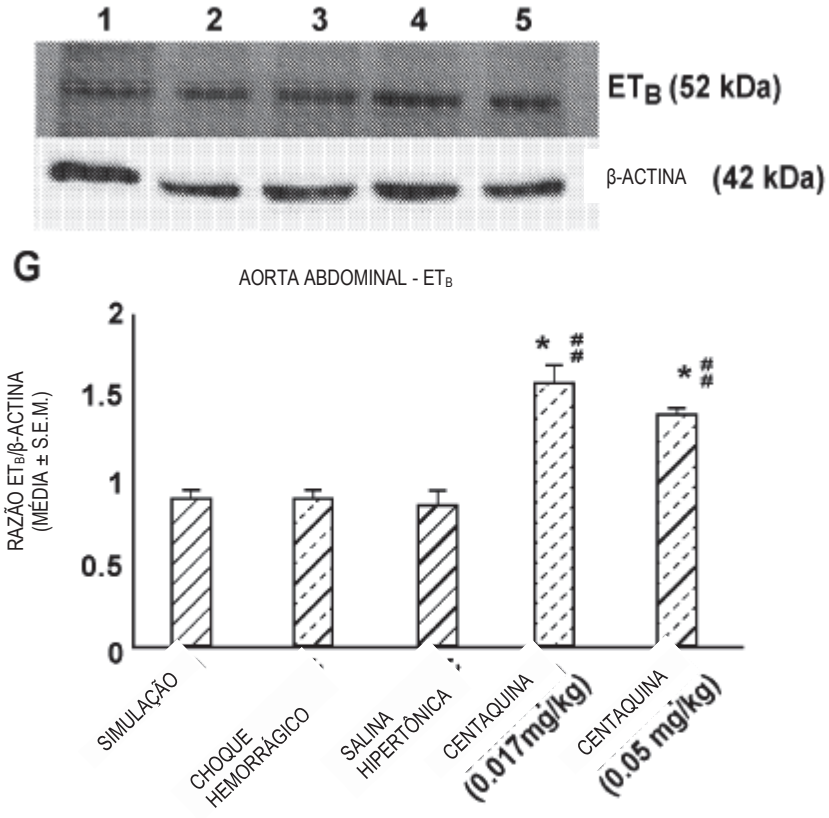


FIGURA 3
(CONTINUAÇÃO)

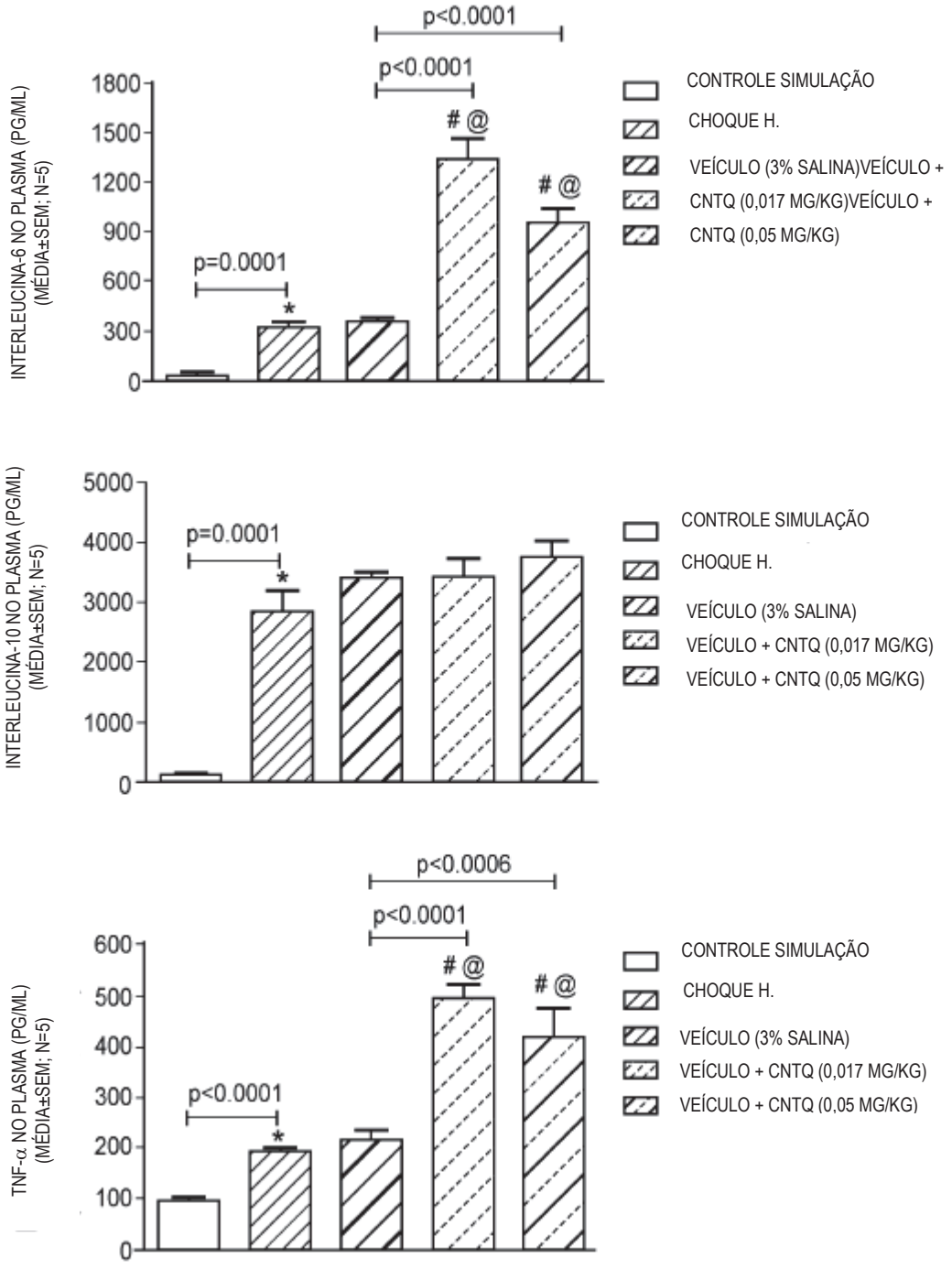

INTERLEUCINA-6 NO PLASMA (PG/ML)
(MÉDIA±SEM; N=5)
1800
1500
1200
900
600
300
0
p<0.0001
p<0.0001
p=0.0001
*
@
@
CONTROLE SIMULAÇÃO
CHOQUE H.
VEÍCULO (3% SALINA)VEÍCULO +
CNTQ (0,017 MG/KG)VEÍCULO +
CNTQ (0,05 MG/KG)
INTERLEUCINA-10 NO PLASMA (PG/ML)
(MÉDIA±SEM; N=5)
5000
4000
3000
2000
1000
0
p=0.0001
*
CONTROLE SIMULAÇÃO
CHOQUE H.
VEÍCULO (3% SALINA)
VEÍCULO + CNTQ (0,017 MG/KG)
VEÍCULO + CNTQ (0,05 MG/KG)
TNF-α NO PLASMA (PG/ML)
(MÉDIA±SEM; N=5)
600
500
400
300
200
100
0
p<0.0006
p<0.0001
p<0.0001
*
@
@
CONTROLE SIMULAÇÃO
CHOQUE H.
VEÍCULO (3% SALINA)
VEÍCULO + CNTQ (0,017 MG/KG)
VEÍCULO + CNTQ (0,05 MG/KG)

FIGURA 4

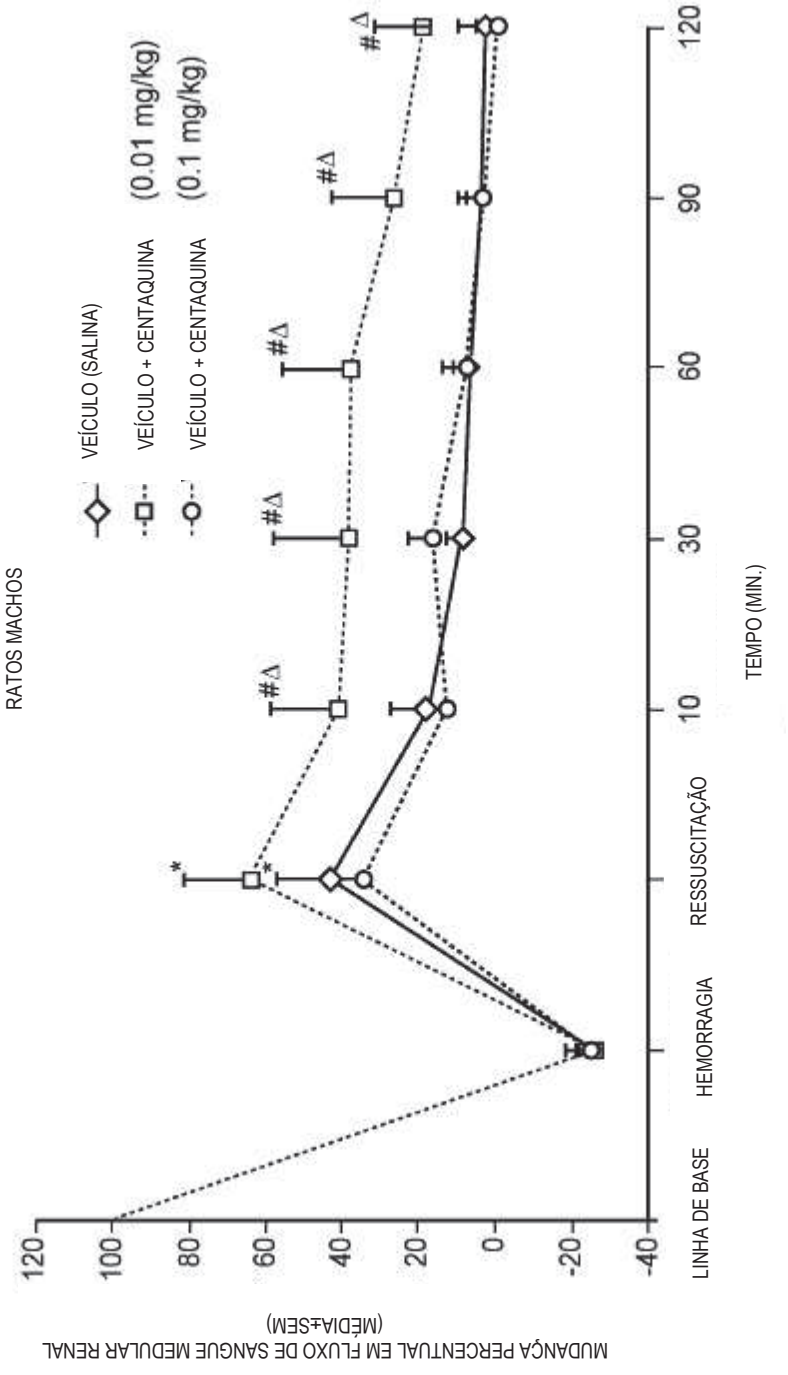

RATOS MACHOS
VEÍCULO (SALINA)
VEÍCULO + CENTAQUINA (0.01 mg/kg)
VEÍCULO + CENTAQUINA (0.1 mg/kg)
MUDANÇA PERCENTUAL EM FLUXO DE SANGUE MEDULAR RENAL (MÉDIA±SEM)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
LINHA DE BASE
HEMORRAGIA
RESSUSCITAÇÃO
10
30
60
90
120
TEMPO (MIN.)
*
#Δ

FIGURA 5

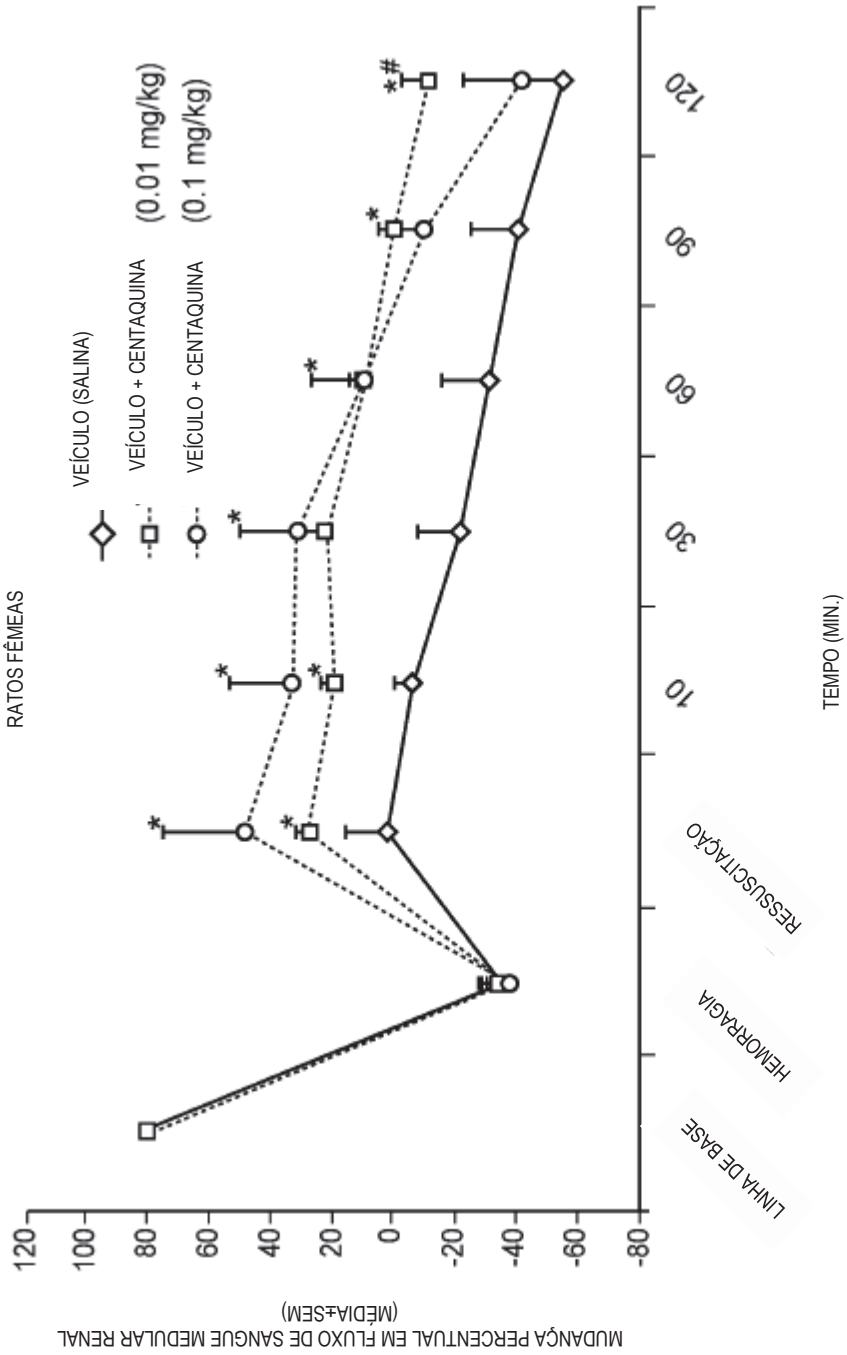

RATOS FÊMEAS
VEÍCULO (SALINA)
VEÍCULO + CENTAQUINA (0.01 mg/kg)
VEÍCULO + CENTAQUINA (0.1 mg/kg)
MUDANÇA PERCENTUAL EM FLUXO DE SANGUE MEDULAR RENAL (MÉDIA±SEM)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
LINHA DE BASE
HEMORRAGIA
RESSUSCITAÇÃO
10
30
60
90
120
TEMPO (MIN.)

FIGURA 6

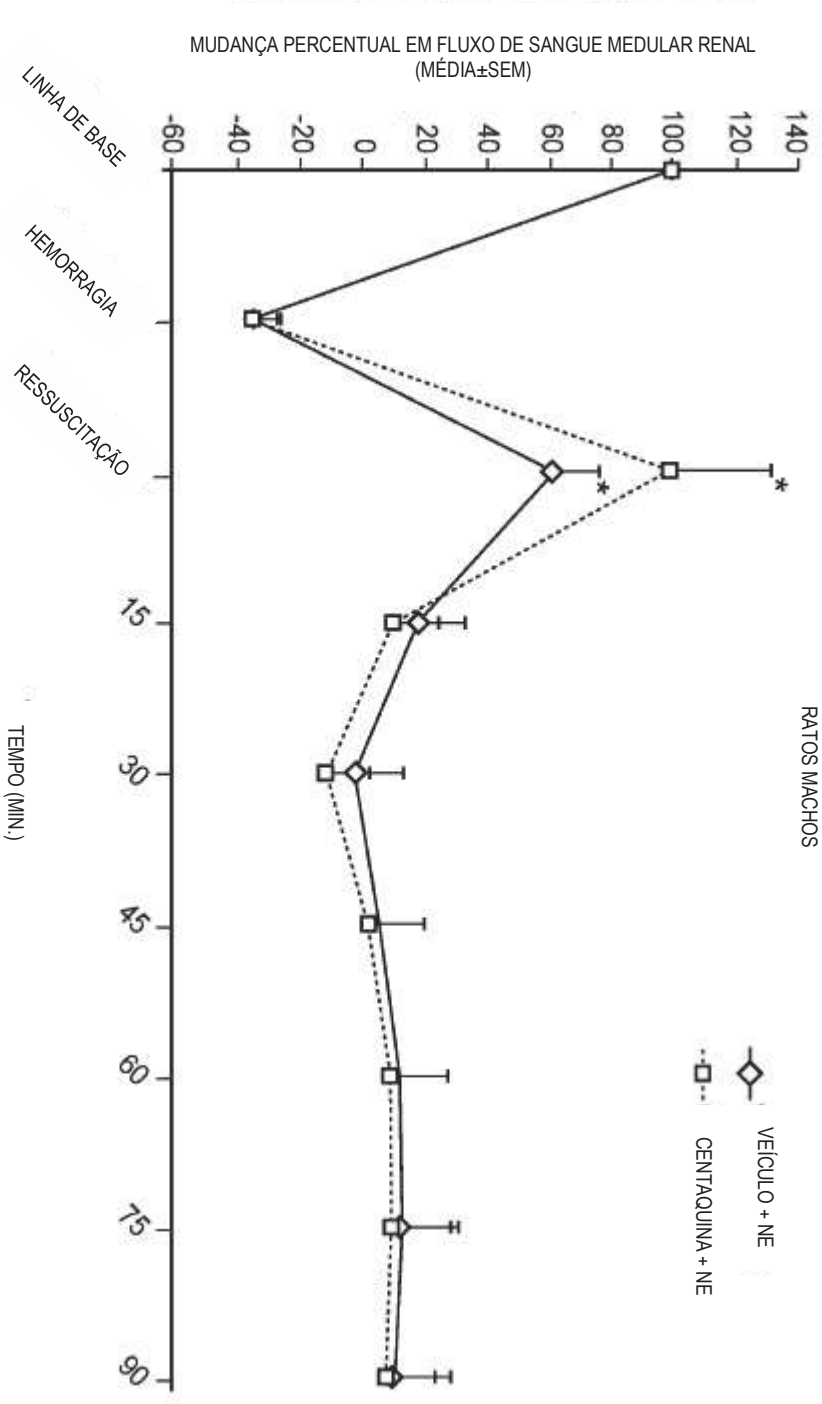

MUDANÇA PERCENTUAL EM FLUXO DE SANGUE MEDULAR RENAL
(MÉDIA±SEM)
-60
-40
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
LINHA DE BASE
HEMORRAGIA
RESSUSCITAÇÃO
15
30
45
60
75
90
TEMPO (MIN.)
RATOS MACHOS
VEÍCULO + NE
CENTAQUINA + NE
*
*

FIGURA 7

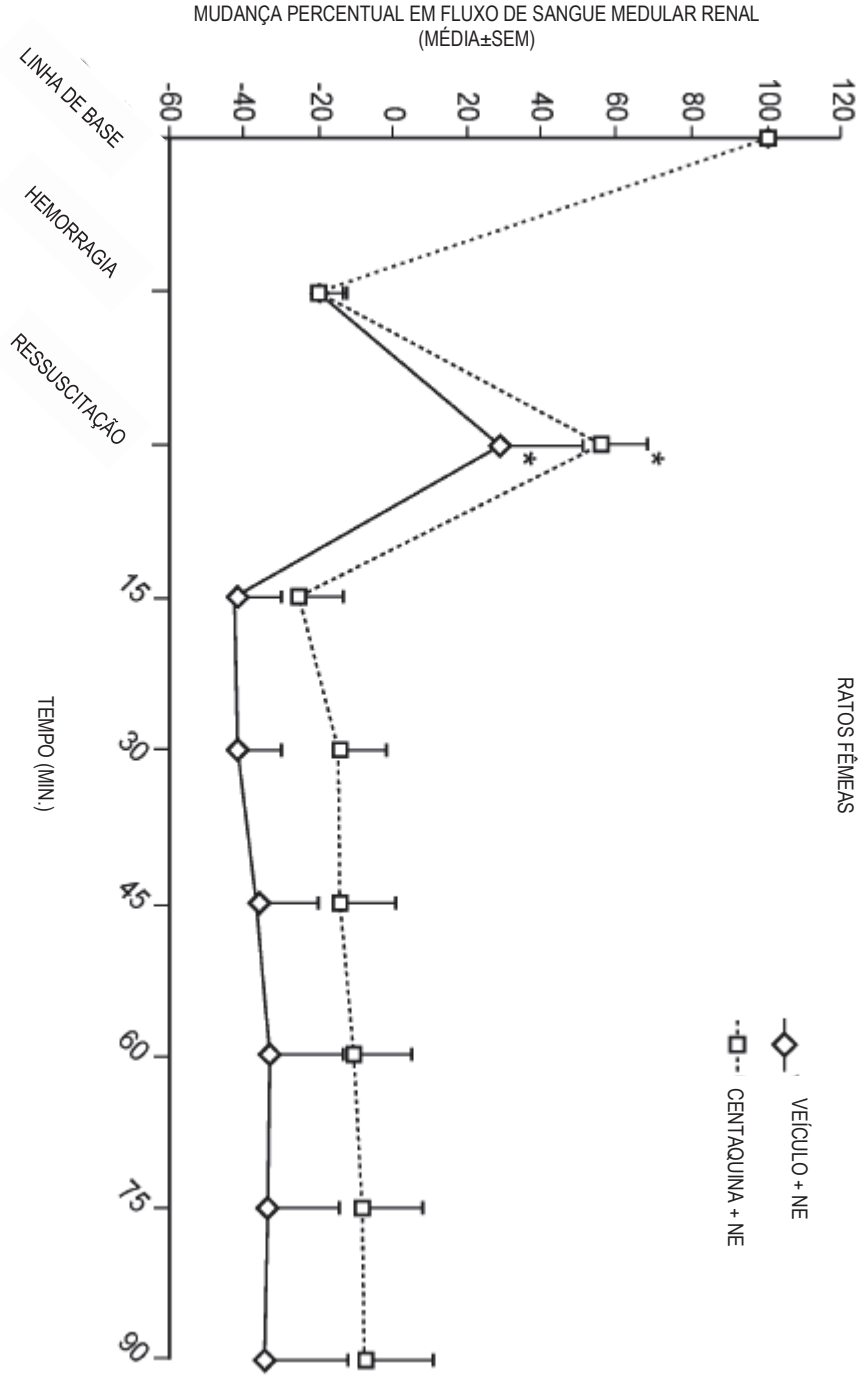

MUDANÇA PERCENTUAL EM FLUXO DE SANGUE MEDULAR RENAL
(MÉDIA±SEM)
-60
-40
-20
0
20
40
60
80
100
120
LINHA DE BASE
HEMORRAGIA
RESSUSCITAÇÃO
*
*
15
30
45
60
75
90
TEMPO (MIN.)
RATOS FÊMEAS
VEÍCULO + NE
CENTAQUINA + NE

FIGURA 8

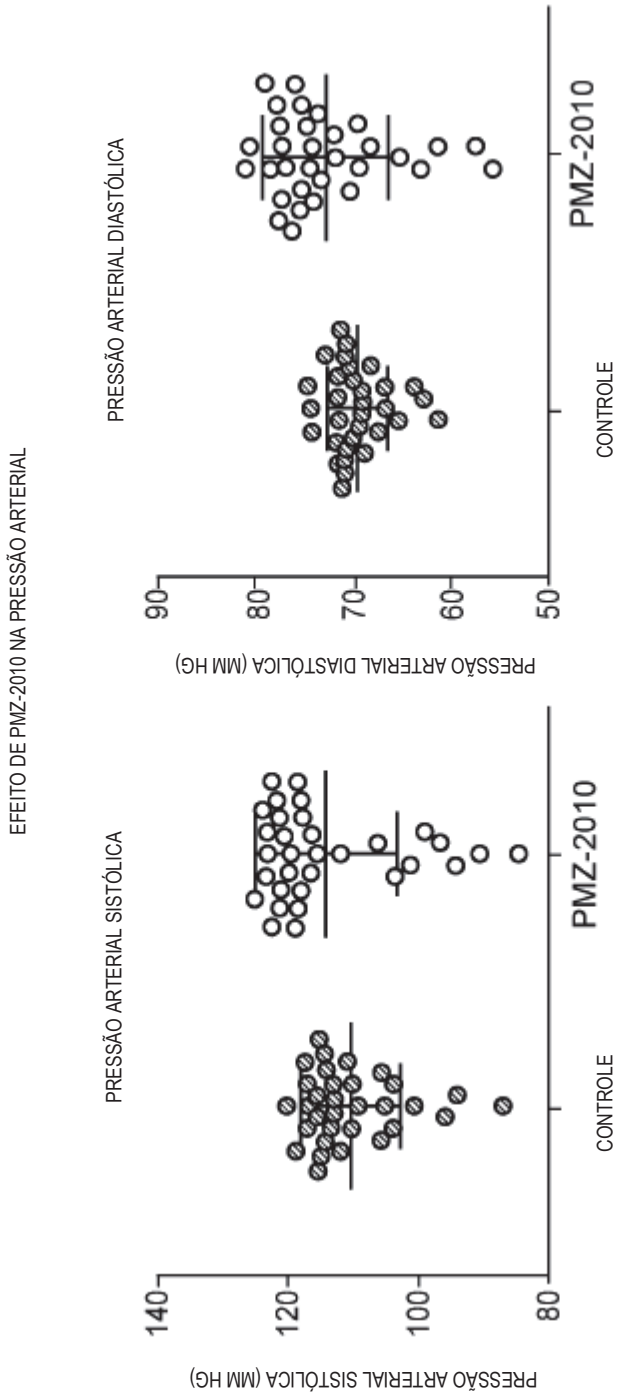

EFEITO DE PMZ-2010 NA PRESSÃO ARTERIAL
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (MM HG)
140
120
100
80
CONTROLE
PMZ-2010
PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA
PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (MM HG)
90
80
70
60
50
CONTROLE
PMZ-2010

FIGURA 9

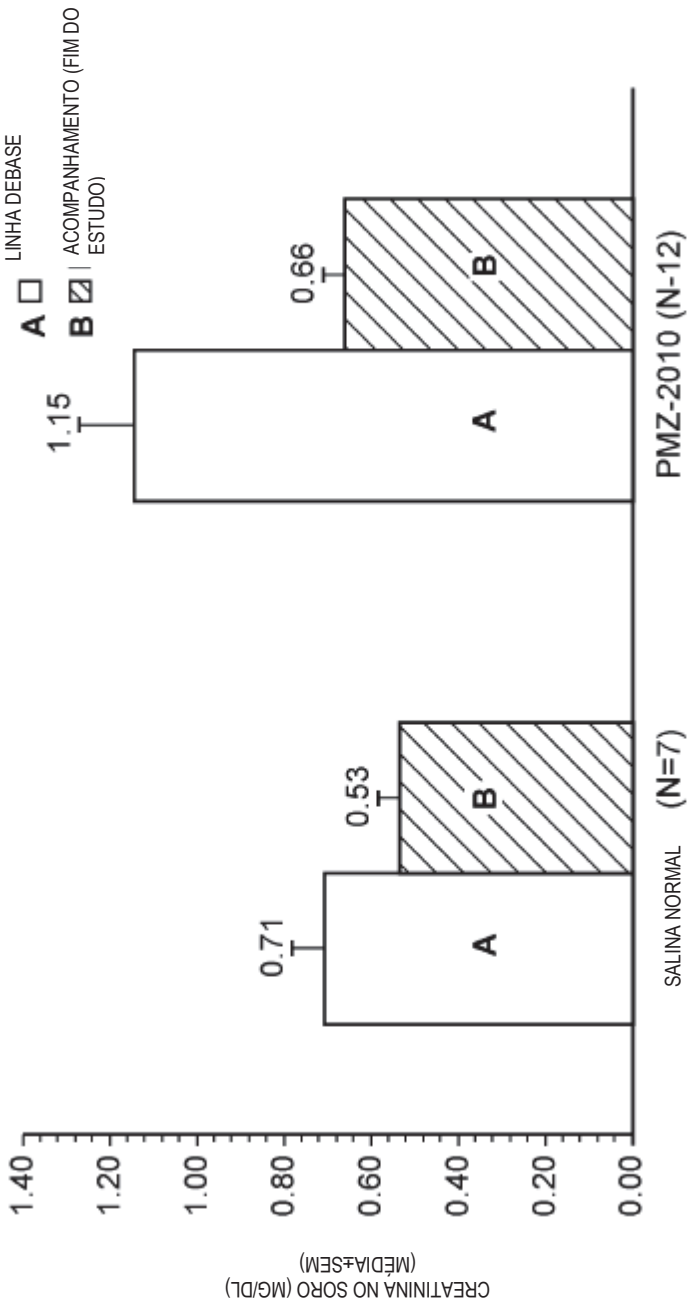

LINHA DEBASE
ACOMPANHAMENTO (FIM DO ESTUDO)
A
B
0.71
0.53
1.15
0.66
SALINA NORMAL (N=7)
PMZ-2010 (N-12)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
CREATININA NO SORO (MG/DL)
(MÉDIA±SEM)

FIGURA 10

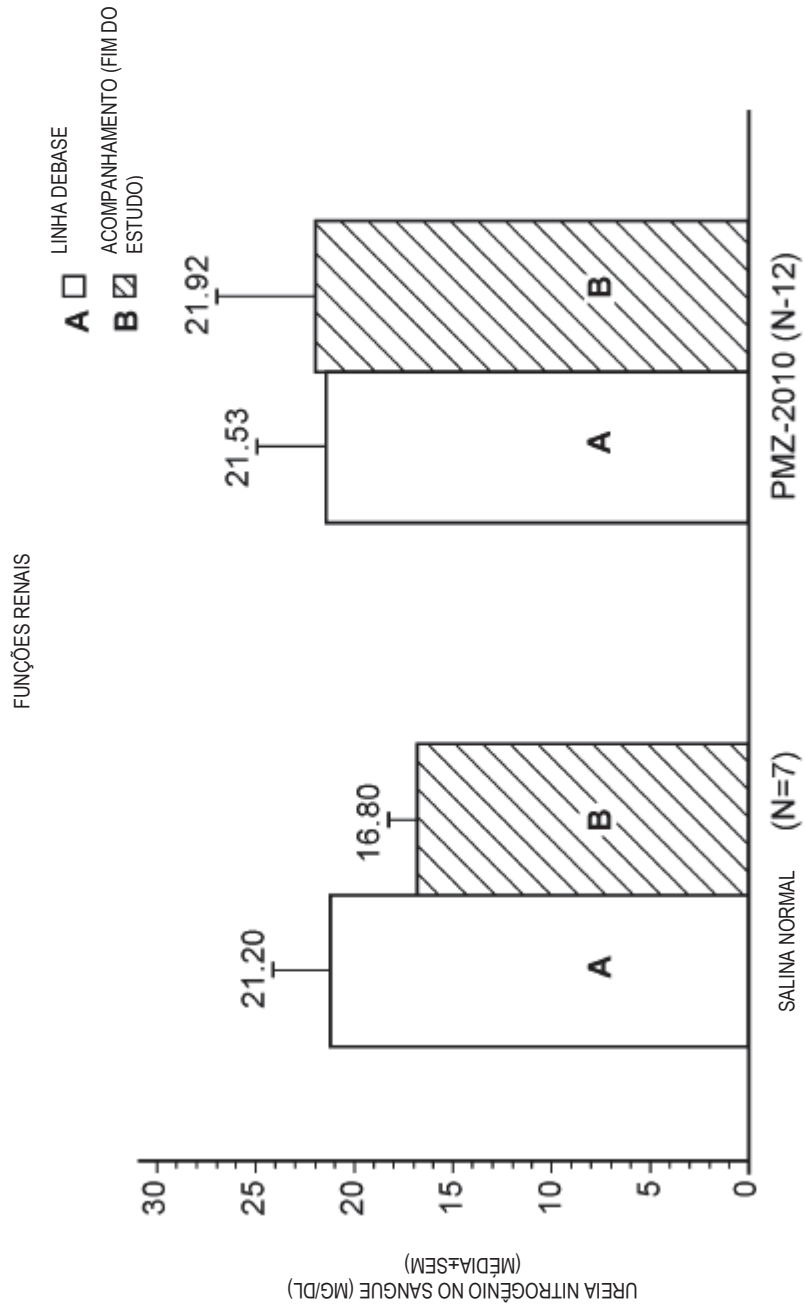

FUNÇÕES RENAIS
A LINHA DEBASE
B ACOMPANHAMENTO (FIM DO ESTUDO)
UREIA NITROGÊNIO NO SANGUE (MG/DL)
(MÉDIA±SEM)
30
25
20
15
10
5
0
21.20
16.80
21.53
21.92
A
B
A
B
SALINA NORMAL (N=7)
PMZ-2010 (N-12)

FIGURA 11

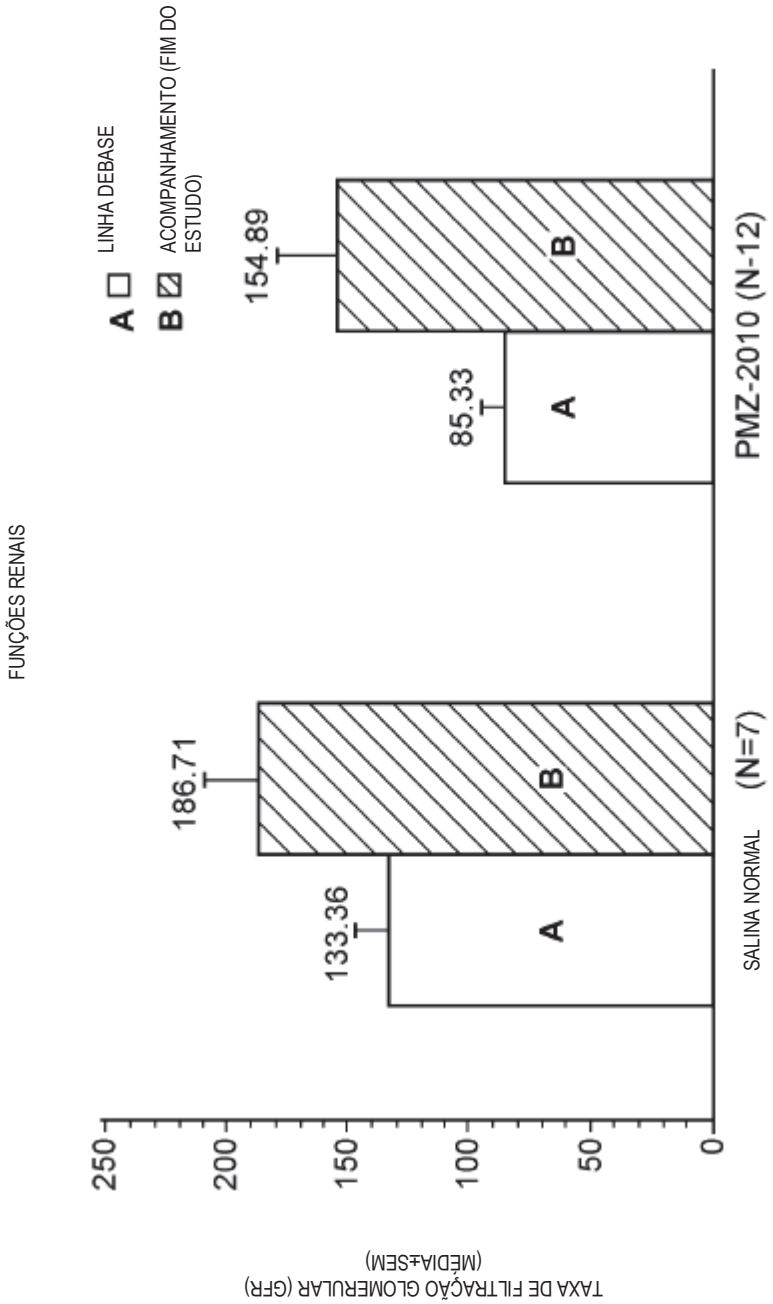

FUNÇÕES RENAIS
A LINHA DEBASE
B ACOMPANHAMENTO (FIM DO ESTUDO)
TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR (GFR)
(MÉDIA±SEM)
250
200
150
100
50
0
133.36
186.71
85.33
154.89
A
B
A
B
SALINA NORMAL (N=7)
PMZ-2010 (N-12)

FIGURA 12

RESUMO

ALTERAÇÕES EM RECEPTORES DE ENDOTELINA EM SEGUIDA A HEMORRAGIA E RESSUSCITAÇÃO POR CENTAQUINA

A presente divulgação se refere a métodos e composições para tratar ou prevenir lesão ou insuficiência renal compreendendo administrar um agonista do receptor de endotelina B (ET_B) e/ou um agente adrenérgico α_2.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2020 50018 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 05/04/2021
- Hora de Geração do Código: 14:09:53
- Código de Controle:
  - Campo 1: 9A275F62996F1047
  - Campo 2: 358AF222A275E7DF