



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0708349-1 A2**

(22) Data de Depósito: 23/02/2007
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/17 2006.01
A61K 38/08 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA E USO DE PEPTÍDEOS**

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2006 CU 2006-048

(73) Titular(es): Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología

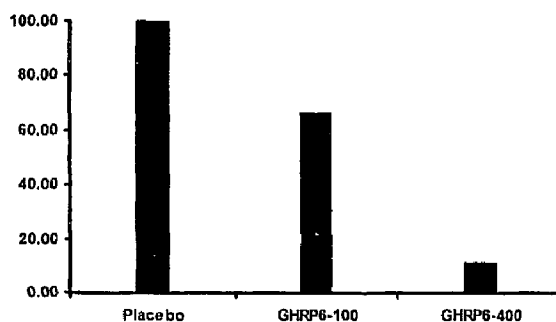
(72) Inventor(es): Danay Cibrian Vera, Diana Garcia Del Barco Herrera, Ernesto Lopez Mola, Gerardo Enrique Guillén Nieto, Jorge Berlanga Acosta, José Suarez Alba, Manuel Selmán-Housein Sosa, Mariela Vazquez Castillo

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT CU2007000005 de 23/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098715 de 07/09/2007

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA E USO DE PEPTÍDEOS A presente invenção se relaciona com o uso de peptídeos secretagogos os quais administrados em uma composição farmacêutica de forma reiterada previnem e eliminam os depósitos de material fibrótico patológico em tecidos parenquimatosos internos como fígado, pulmões, esôfago, intestino delgado, rins, vasos sanguíneos, articulações, além de formas sistêmicas de fibrose cutânea de qualquer etiopatogenia. Adicionalmente estes peptídeos impedem e eliminam o depósito de material amilóide e hialino em qualquer de suas formas químicas e manifestações tecidulares; entre outras do cérebro, cerebelo, vasos sanguíneos, fígado, intestinos, rins, baço, pâncreas, articulações, e a pele. Desta forma corrige-se a disfunção de células, tecidos e órgãos afetados por estes depósitos anormais. Os peptídeos da presente invenção administrados por infiltração ou tópicos contribuem a prevenir e eliminar os quelóides e as cicatrizes hipertróficas na pele por seqüelas de queimaduras, e outros traumas cutâneos.



“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE PEPTÍDEOS”

Campo da Técnica

A presente invenção se refere ao campo da indústria farmacêutica e à medicina, mais especificamente com o uso de peptídeos secretagogos os quais administrados em uma composição farmacêutica de forma reiterada, previnem e eliminam os depósitos de material fibrótico patológico em tecidos parenquimatosos internos como fígado, pulmões, esôfago, intestino delgado, rins, vasos sanguíneos, articulações, além de formas sistêmicas de fibrose cutânea de qualquer etiopatogenia.

10 Estado da Técnica Anterior

Os processos de fibroses são um conjunto de entidades patológicas de caráter mono-orgânico ou sistêmico que se caracterizam pelo depósito anormal de matriz extracelular no parênquima de quase todos os órgãos internos, os vasos sanguíneos, ou a pele. Estas são consideradas como a resultante de complexos processos de base auto-imune ou de respostas intersticiais a eventos imitativos e inflamatórios prolongados. Em sentido geral, ocorre um depósito excessivo de material colágeno no parênquima por células intersticiais efetoras, ou a partir do material estromático que se expande e oblitera o tecido funcional. As células efetoras destes processos são de origem mesenquimatosa e costumam ser bastante específicas de acordo com o tecido afetado. Em sentido geral atribui-se aos miofibroblastos os processos de fibroses patológicas. Os mecanismos que favorecem a implantação das fibroses são complexos, e resultam ainda pouco conhecidos. De todas formas, com independência do órgão alvo em questão insiste-se na participação do fator de crescimento transformante tipo beta (TGF- β), do fator de crescimento derivado do tecido conectivo (CTGF) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). As fibroses em longo prazo são geralmente mortais e não têm cura até o presente. A seguir serão abordados alguns aspectos teóricos referidos aos processos de fibroses em alguns órgãos

(Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo E, Luo H, Yu H. *Ginkgo biloba* extract alleviates liver fibrose induced by CCl₄ in rats. *Liver International* 2005; 25: 1224-1232.) (Friedman SL. Reversal of hepatic fibrose - Fact or fantasy? *Hepatology*. 2006 Jan 30;43(S1):S82-S88)

5 Fibrose hepática

Quando se ocasiona um dano ao fígado, a resposta inflamatória e a remodelação da matriz extracelular (ME) restauram a função e a arquitetura normal deste órgão. No entanto, quando o dano persiste, existe um desequilíbrio entre os fatores que tentam reparar e chegar à resolução do problema ocasionando uma alteração na regulação da ME e provocando a síntese excessiva de seus componentes. O fígado é o principal órgão envolvido na regulação do metabolismo, no processo de filtragem do sangue e na regulação hormonal. As células estreladas hepáticas (HSC) localizam-se no espaço que se forma entre as células endoteliais e os hepatócitos, chamado espaço de Disse ou espaço sinusoidal, desde onde rodeiam às células endoteliais com seus longos processos citoplasmáticos. As HSC são capazes de sintetizar e secretar componentes da ME e representam uma fonte importante em processos fibróticos. Estas células se caracterizam pelo armazenamento de ésteres retinílico, a síntese de fatores de crescimento e outras citocinas, além de seu papel na regulação do fluxo sanguíneo sinusoidal. As HSC podem passar de um estado quiescente a um estado ativo que é induzido pela secreção parácrina de citocinas inflamatórias, pela produção de espécies reativas do oxigênio ou bem por mudanças na estrutura da ME que ocasionam mudanças no fenótipo celular. Durante sua ativação as HSC se diferenciam aos miofibroblastos adquirindo uma forma alongada, expressam α -actina de músculo liso e perdem o retinol armazenado. Neste estado as HSC adquirem novas propriedades que lhes ajudam a manter e amplificar a resposta inflamatória: capacidade proliferativa, contratibilidade, produção de citocinas e principalmente a síntese e secreção de componentes

de ME. Entre os principais fatores que ocasionam a produção de proteínas de ME em HSC ativadas está o TGF- β , sintetizado principalmente na fase de ativação por células de Kupffer; na fase de perpetuação, o TGF- β chega a ser produzido principalmente pelas HSC ativadas perpetuando sua ativação. Em sentido geral, qualquer das formas de induração fibrótica do fígado, é incompatível com a vida (Hepatic Failure. Last Updated: September 3, 2004. Editor(s): David Eric Bernstein, MD, Chief, Section of Hepatology, North Shore University Hospital, Director, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Division of Hepatology, New York University School of Medicine; Francisco Talavera, PharmD, PhD, Senior Pharmacy Editor, eMedicine; Oscar S Brann, MD, Associate Clinical Professor, UCSD School of Medicine; Program Director of Gastroenterology Fellowship, Department of Internal Medicine, Naval Medical Center San Diego; Alex J Mechaber, MD, FACP, Director of Clinical Skills Program, Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Division of General Internal Medicine, University of Miami School of Medicine; and Julián Katz, MD, Professor, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, MCP Hahnemann University) (Sarem M. Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. Gastroenterol Hepatol. Fev. 2006; 29(2):93-101).

Fibrose pulmonar

A fibrose pulmonar é uma doença lentamente progressiva que inclui um grupo diverso de entidades. Histologicamente, caracteriza-se por uma heterogeneidade temporária das lesões, predominando os de miofibroblastos. Ainda que a seqüência de eventos na patogenia da fibrose pulmonar esteja bem documentada, há pouca informação sobre os mecanismos exatos envolvidos no dano inicial. É possível que sejam importantes os fenômenos imunológicos sobretudo, auto-imunes. Os fatores genéticos também devem desempenhar algum papel. Microscopicamente, uma característica constante é a mudança hiperplásica nas células epiteliais

alveolares (neumócitos tipo 2) com nucléolo proeminente e atipia citológica, que com frequência imitam uma infecção viral. Ultra-estruturalmente, é possível encontrar inclusões tubulares intra-nucleares. O processo de depósito de matriz e particularmente de material colágeno no parênquima do pulmão vai insidiosamente deteriorando sua arquitetura, colapsando brônquios, e alvéolos que ao final deixam de constituir território funcional para passar a ser não funcional, e que excessivamente compromete a ventilação no pulmão. Neste processo novamente, envolve-se o TGF- β como uma das principais citocinas que orchestra o processo. Os miofibroblastos são as células efectoras produtoras de matriz. (Medranda Gomez MA, Paricio Nunez P, Tovar Martinez A, Ferrer Marin F, Gonzalez Martinez P, Garcia Puche MJ. Pulmonary fibrose. Rev Esp Enferm Dig. 2005 Nov; 97(11):843-4)

Fibroses sistêmica cutânea ou Escleroderma

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença extremamente complexa. Até a atualidade não existe nenhuma hipótese única que explique sua patogênese. No entanto, anormalidades fundamentais em fibroblastos; células endoteliais, células do sistema imunológico, em particular, linfócitos T e B. As alterações funcionais nestas células ocasionam a característica triada de mudanças patológicas em ES: fibrose cutânea e visceral progressiva, obliteração do lúmen de pequenas artérias e arteríolas, e anormalidades na imunidade. As alterações na imunidade humoral e celular originam a produção de numerosos anticorpos, alguns dos quais são altamente específicos para a doença, a infiltração crônica de células mononucleares nos tecidos afetados e a desregulação da produção de linfocinas e fatores de crescimento. Até agora, não está claro qual destas alterações é de primordial importância ou como estão inter-relacionadas para causar o processo fibrótico progressivo na ES. No entanto, um componente crucial desta patogênese é a ativação não regulada e persistente dos genes que codificam vários tipos de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular nos fibroblastos de

pacientes com ES. Esta é a diferença mais importante entre os fibroblastos normais, os quais promovem cicatrização normal e os fibroblastos na ES os quais mostram uma incontrollada produção e deposição de colágeno dando como resultado uma fibrose patológica nos órgãos afetados. Novamente, um dos fatores de crescimento que parece ter um papel crucial na fibrose tissular da ES é o TGF-beta. Um de seus mais importantes efeitos é a estimulação da síntese de vários tipos de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular incluindo fibronectina (31). Os fibroblastos de pacientes com ES expressam altos níveis de receptores para TGF-beta em sua superfície o que pode ser responsável pelo incremento do sinal induzido por TGF-b e do aumento da produção de colágeno (30). Esta doença é também mortal e incurável (Steen V. Targeted therapy for systemic sclerosis. Autoimmun Rev. Fev. 2006; 5(2): 122-4.)

Nefroesclerose diabética ou Nefropatia Diabética.

Quase todos os pacientes diabéticos desenvolvem engrossamento das membranas basais glomerular e tubular aos 2 ou 3 anos do diagnóstico da doença. Alguns deles chegarão a desenvolver expansão do mesângio glomerular e fibrose intersticial, as marcas patológicas da nefropatia diabética progressiva. Com o tempo, a nefropatia evolui e clinicamente se manifesta como o surgimento de proteinúria, hipertensão e insuficiência renal. Existe uma boa correlação entre a expansão da região do mesângio, a severidade da fibrose intersticial e a arteriosclerose, com a baixa da taxa de filtração glomerular. Isso tem como consequência que a expansão mesangial reduz a filtração glomerular por oclusão dos capilares glomerulares e diminuição da área efetiva para a filtração. Da mesma maneira, a fibrose túbulo-intersticial altera a arquitetura e função tubular e isso conduz a insuficiência renal. Nesta doença também se estabeleceu o papel do TGF-beta na orquestração dos processos fibrosos que ocorrem no rim dos pacientes diabéticos. Esta doença tem um curso progressivo, insidioso e termina com a

vida do paciente por Insuficiência Renal (Cohen, M. P., Ziyadeh, F. N., Hong, S. W., Shearman, C. W., Hud, E., Lautenslager, G. T., Iglesias-de la Cruz, M. C, & Chen, S. (2002). Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta et al. Kidney Int, 61: 2025-2032),
 5 (Ziyadeh, F. N., Hoffman, B. B., Han, D. C, Iglesias-de la Cruz, M. C, Hong, S. W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T. A., & Sharma, K. (2000). Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF-beta antibody in db/db diabetic mice. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 97:
 10 8015-8020)

Fibrose do Pênis ou Doença de Peyronie

Conceitualmente a doença é uma cicatriz patológica da albugínea peniana que pode ocasionar em estado de repouso retração do órgão, e em ereção, curvatura e retração. Apesar de não poder se precisar o
 15 início da doença, a maioria dos autores coincidem em que a degeneração fibrótica da túnica albugínea é precedida por um fenômeno inflamatório que poderia ser desencadeado por um processo vasculítico, imunológico, um traumatismo, ou uma collagenopatia. Descreve-se um primeiro período de invasão onde a placa fibrótica pode progredir em forma silenciosa denotando
 20 a curva ou a retração do pênis, apresentando dor na ereção ou durante a penetração. Os sintomas que predominam são os originados pela fibrose. Alguns pacientes podem apresentar, além disso, associados a estes sintomas, a fibrose da cartilagem do lóbulo da orelha. Ainda que não seja uma doença mortal, compromete seriamente a qualidade de vida dos pacientes.
 25 Novamente se invoca ao TGF-beta como agente indutor ou amplificador da base molecular da doença (Jakut M. New discoveries in the basic science understanding of Peyronie's disease. Curr Urol Rep. 2004 Dec;5(6):478-84)

Doença Microvascular do Cérebro

A vasculopatia foi identificada em cérebros por exemplo de

pacientes afligidos pela Doença de Alzheimer como um marcador que pode representar um importante fator patogênico nesta doença e outras formas de demência. A distribuição laminar e regional das lesões vasculares se correlaciona com a presença de novos neurofibrilares e placas senis. Faz
5 mais de 100 anos foi descrito pela primeira vez anomalias morfológicas nos vasos cerebrais dos idosos, que consistiam em rigidezes, tortuosidades e anelamentos. Faz menos de 20 anos estas anotações receberam total respaldo enquanto se descreveu que os capilares do hipocampo senil se distorciam mais com a idade do que os grandes vasos. A nível ultraestrutural,
10 distinguem-se: (a) inclusões membranosas dentro da membrana basal; e (b) depósitos microvasculares de colágeno (fibrose) ou engrossamento dos componentes da membrana basal. Com a idade se produz um marcado incremento da degeneração de pericitos nos capilares. Os depósitos de fibras de colágeno no interior da membrana basal foram observados no cérebro de
15 mamíferos. A periodicidade de 64 nm nestas fibras permitiu identificar a natureza colagênica desta fibrose microvascular, com assento entre o endotélio e os pericitos ou na face externa da membrana basal. O engrossamento da membrana basal e os depósitos de colágeno são similares em ratos e seres humanos com a idade e se considera que estes processos de
20 degeneração esclerose fibrótica da microvasculatura cerebral são a base anatômica dos processos demenciais em general. Estas doenças pioram clinicamente na medida que a circulação cerebral se dificulta pela oclusão das redes arteriolares e terminam provocando a ausência de toda vida de relação social coerente e de atividade cognitiva. O papel da doença vascular na
25 patogênese da demência está sendo reavaliado no momento atual enquanto se sugere que mais de 50% das pacientes com demência têm algum estigma de doença vascular cerebral. Existem outros processos neuro-cerebrais de tipo demenciais não de tipo Alzheimer nos que a pessoa experimenta séria deterioração da memória, da aprendizagem e das habilidades em general. O

mais representativo destes processos é talvez a leuco-encefalopatia arterial cerebral autossômica com enfartes subcorticais (CADASIL- iniciais de seu nome em inglês). A doença não tem uma base molecular e celular compreendida. Não obstante sabe-se que as arteriopatas dadas por depósito de material granular osmiofílico que vai paulatinamente ocluindo a luz das artérias, provocando focos de isquemia no cérebro com o subsequente episódio de enfarte. A perda da viabilidade neuronal pelos microinfartos leva à deterioração da atividade nervosa superior do cérebro, e por tanto a um estado de senilidade e demência (Nakanao I. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. Curr Neurovasc Res. 2005 Dec;2(5):409-23.; Mott RT. Neuropathology of Alzheimer's disease. Neuroimaging Clin N Am. 2005 Nov;15(4):755-65).

Outros processos degenerativos. Acumulação de Beta Amilóide

A doença de Alzheimer, a demência de maior prevalência em maiores de 65 anos, é uma das principais causas de morte neste grupo de idade. Ainda que a origem da doença ainda não seja conhecida, os cérebros dos pacientes de Alzheimer apresentam acúmulo de diversos tipos de proteínas dentro e fora dos neurônios que estariam relacionados com a doença. A beta amilóide é uma dessas proteínas que atua na formação de depósitos cerebrais extracelulares à medida que se envelhece. A demência de Alzheimer tem um início insidioso com um declinar progressivo das funções mentais superiores, afetando a memória de fixação e de evocação. Os achados neuropatológicos se concretizam em acúmulo de placas neuríticas e de novos neurofibrilares nas zonas vulneráveis do cérebro e do troncoencéfalo. As placas contêm um núcleo compacto de beta-amilóide, um oligopeptídeo derivado do precursor da proteína beta-amilóide. O risco para desenvolver uma demência é fortemente visto associado ao polimorfismo da apolipoproteína E. No cérebro, a Apo-E interage com a beta-amilóide, e a

Apo-E4 se associa com um depósito aumentado de beta-amilóide e um númeroS aumentadoS de novos neurofibrilares.

Tanto a atenção como os processos da memória e de aprendizagem são os pontos de afetação das funções cerebrais mas afetadas na doença de Alzheimer como modelo das doenças demenciais que cursam com acumulação de beta-amilóide. Até agora, existe um único fármaco aprovado pela FDA para o tratamento do déficit cognitivo da doença de Alzheimer. A proteína beta-amilóide tem efeitos necrogênicos sobre as células cerebrais, mediado pela ação dos radicais livres. O depósito de beta-amilóide no parênquima cerebral é um fato distintivo da patogênese da doença de Alzheimer, ainda que também ocorra em menor grau no envelhecimento normal.

A redução da síntese da forma neurotóxica da proteína beta-amilóide pode atenuar o processo que contribui para o dano neuronal na doença de Alzheimer. Assim mesmo sua eliminação do cérebro e sua posterior excreção contribuiria para a melhoria das funções nervosas superiores dos pacientes. A doença de Alzheimer deteriora severamente a qualidade de vida do paciente, e não tem cura até o presente Gurol ME. Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2006 Jan 10; 66(1):23-9.; Han HS. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res*. 2005 Dec;2(5):409- 23; Anderson E. The Organic Brain Syndrome (OBS) scale: a systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2006 Jan 27.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de animais por grupo com compromisso de fibrose renal ao final do tratamento com GHRP-6. Nota-se a diferença existente entre o grupo de animais placebo que recebe solução salina e aqueles que recebem GHRP-6. A diferença mais alta é observada ao

comparar o grupo placebo com o que recebe a dose de 400 µg/kg - o que sugere um efeito dose-dependente. Avaliação histológica da reação fibroproliferativa no interstício renal. Inclui o processo de encapsulação fibrótica de túbulos e glomérulos fibróticos. Desta forma se estabelece o grau de fibrose renal total que se emprega para determinar a porcentagem de animais afetados ou não ao final do tratamento, (a) - significa diferença estatística de $p < 0.001$ entre o grupo de dose de 400µg/kg de GHRP-6 e o placebo.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Reversão da fibrose hepática em ratos

O objetivo do presente experimento foi o de avaliar o efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP-6 na reversão da fibrose hepática em ratos. Induziu-se fibrose hepática em ratos Wistar macho de 250 gramas de peso corporal médio mediante a ligadura do conduto biliar externo. Para isso os ratos foram anestesiados com a combinação cetamina/xilazina e submetidos a uma laparotomia até expor o conduto biliar comum. Este foi duplamente ligado com catgut cromado 4-0. Depois de concluída a cirurgia os animais foram aleatoriamente atribuídos em três grupos experimentais de 20 ratos cada um: (1) Grupo placebo de controle que recebe solução salina fisiológica. (2) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 100 µg/kg, (3) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 400 µg/kg. Os tratamentos foram administrados todos os dias em espaço de três semanas depois de induzido o processo de fibrose do parênquima do fígado. Todos os tratamentos começaram três semanas depois de estabelecida a fibrose. O seguimento do processo de dano hepático foi realizado mediante exame de ultra-som semanal da área de projeção do órgão, evolução dos níveis séricos de transaminases GOT e GPT, níveis de gama glutamil transferase (GGT) e volume de ascites. Os tratamentos com GHRP-6 ou placebo foram realizados uma vez ao dia pela via intraperitoneal. Concluídos os tratamentos os animais foram sacrificados por sobre doses de anestesia e se procedeu à extração do fígado e

do soro sanguíneo. Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina neutra e processados com as colorações de hematoxilina/eosina ou tricrômica de Masson para avaliação do dano geral e da severidade da induração da fibrose. Outros fragmentos de fígado foram conservados a -70°C até seu processamento para determinar o conteúdo de hidróxi-prolina mediante hidrólise ácida em 1 N HCl, bem como os níveis intra-hepáticos de indicadores do metabolismo redox. As determinações bioquímicas foram realizadas sobre a base do cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford.

- 10 **Tabela 1.** Escala de gradação do processo: (0) - nula, (1) - moderada, (2) - limitada, (3) - severa, (4) - muito severa.

Grupo experimental	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Placebo (N=14)	0	0	2	5*	7(50%)*
Dose I (N=16)	5	9	2	0	0
Dose II (N=20)	8	11	1	0	0

* $p < 0.001$. Prova de Chi quadrado.

Tabela 2. Avaliação dos níveis de hidróxi-prolina no fígado ao final de três semanas de tratamento.

Grupo experimental	Conteúdo de OH-P ($\mu\text{g/g}$ de proteínas totais)
Placebo (N=14)	$133,25 \pm 21,69^{**}$
Dose I (N=16)	$56,71 \pm 8,11^{*}$
Dose II (N=20)	$16,15 \pm 1,025$

- 15 ****** $p = 0.00021$. Placebo vs. Tratados. ***p** = 0.001 Dose I vs. Dose II. Prova de t de Student de duas filas.

Tabela 3. Níveis séricos de GOT, GPT e GGT nos grupos ao concluir as três semanas de tratamento.

Grupo experimental	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	GGT (IU/L)
Animais intactos	$32,56 \pm 9,27$	$20,93 \pm 7,74$	$23,62 \pm 5,21$
Placebo (N=14)	$115,84 \pm 27,80^{**}$	$155,30 \pm 11,63^{**}$	$143,18 \pm 25,36^{**}$
Dose I (N=16)	$61,58 \pm 16,10^{*}$	$81,71 \pm 30,90^{*}$	$71,53 \pm 22,14^{*}$
Dose II (N=20)	$30,41 \pm 6,11$	$60,64 \pm 19,87$	$25,56 \pm 8,63$

****** $p = 0.0003$. Placebo vs. Tratado Dose II e Intactos. ***p** = 0.0002 Dose I vs.

- 20 Dose II e Intactos. Não existiram diferenças entre Intactos e Doses II. Prova de t- de student de duas filas.

Tabela 4. Nível de marcadores de estresse oxidativo nas mostras de fígado ao final da terceira semana de tratamento.

Grupo experimental	SODt	Catálase	HPT	MDA
Grupo intacto	28261,08±1260,94	16,40±3,95	27,25±2,47	0,06±0,01
Grupo salina-placebo	573,83±645,93**	580,58±57,39**	108,66±15,82**	0,25±0,04**
Grupo Dose I	11058,07±744,61*	68,50±12,73*	43,06±1,83*	0,14±0,02*
Grupo Dose II	21029,87±498,28	31,50 ± 4,3	21,16 ± 1,71	0,08±0,01

** p = 0.0001. Placebo vs. Tratado Dose II e Intactos. *p = 0.0003 Dose I vs. Dose II e Intactos. Não existiram diferenças entre Intactos e Doses II. Prova de t de Student de duas filas.

O tratamento com GHRP-6 claramente demonstra a capacidade deste peptídeo para eliminar e controlar o depósito de material colágeno e de matriz extracelular em general no parênquima do fígado como consequência da ligadura do conduto biliar comum. A importância do tratamento se demonstra na convergência dos dados morfológicos e bioquímicos que sustentam que apesar de haver insaturado um estado de severo compromisso fibrótico peri-ductal e peri-portal em general, este pode ser levado a níveis desprezíveis sem recorrência. Destaca-se que os animais do grupo placebo não mostraram recuperação espontânea.

Exemplo 2. Reversão da fibrose hepática em ratos

O objetivo do presente experimento foi o de avaliar o efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP-6 na reversão da fibrose hepática em ratos, nesta ocasião induzida por tetracloreto de carbono (CCL4). Este é um agente hepato-tóxico que provoca hepatite crônica e fibrose quando se administra a longo prazo. Induziu-se a fibrose hepática em ratos Wistar macho de 250 gramas de peso corporal médio mediante a inoculação intraperitoneal duas vezes por semana de CCL4 50%/50% (V/V) em azeite de oliva, em espaço de 4 semanas. Decorrido o período de administração, 25% da população de ratos tratadas foi sacrificada e submetida a estudo de bioquímica sanguínea e de anatomia patológica. O processo de fibrose do

figado foi demonstrado em todos os animais estudados. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais de 15 ratos cada um: (1) Grupo que recebe solução salina fisiológica-controle placebo. (2) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 100 µg/kg, (3) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 400 µg/kg. Os tratamentos foram administrados todos os dias em espaço de quatro semanas depois de demonstrado o processo de fibrose do parênquima do fígado. Os tratamentos começaram imediatamente depois de estabelecida a fibrose e de suspendida a administração do CCI4. Concluídos os tratamentos os animais foram sacrificados por sobre doses de anestesia e procedeu à extração do fígado e do soro sanguíneo. Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina neutra e processados com as colorações de hematoxilina/eosina ou tricrômica de Masson para avaliação do dano geral e da severidade da induração da fibrose. Outros fragmentos de fígado foram conservados a -70°C até seu processamento para determinar o conteúdo de hidróxi-prolina mediante hidrólise ácida em 1 N HCl, bem como os níveis intra-hepáticos de indicadores do metabolismo redox. As determinações bioquímicas foram realizadas sobre a base do cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford. A caracterização da resposta ao tratamento com a composição farmacêutica foi realizada mediante a determinação dos níveis séricos de transaminases GOT e GPT, critérios histológicos em escala quantitativa e alguns marcadores críticos, eloqüentes do nível de dano lipoperoxidativo.

Tabela 5. Escala de gradação do processo: (0) - nula, (1) - moderada, até 25% do corte (2) - limitada até 50% do corte, (3) - severa, até 75% do corte (4) - muito severa, mais de 75% do corte. Avaliação histológica da reação fibroproliferativa em padrão de pontes. Inclui conjuntamente a existência de Necrose na zona III. Número de animais por grupo segundo grau de compromisso ao final do tratamento.

Grupo experimental (n=15)	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Placebo	0	0	0	5*	10**
Dose I	0	9	6*	0	0
Dose II	8*	7	0	0	0

*p < 0.001. Prova de Chi quadrado. Grau 0. Grupo II vs. Placebo e Dose Grau 1. Dose I e II vs. Placebo. Placebo, graus 3 e 4 vs. Animais tratados.

Tabela 6. Avaliação dos níveis de hidróxi-prolina no fígado ao final do tratamento.

Grupo experimental (N=15)	Conteúdo de OH-P (µg/g de proteínas totais)
Placebo	86,19 ± 11,43**
Dose I	40,21 ± 3,54*
Dose II	10,22 ± 4,33

5 ** p = 0.00021. Placebo vs. Tratados. *p=0.001 Dose I vs. Dose II. Prova de t de Student de duas filas.

Tabela 7. Níveis séricos de GOT e GPT nos grupos ao concluir o tratamento.

Grupo experimental	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Animais intactos	31,56 ± 6,55	18,77 ± 6,53
Placebo	111,97 ± 36,50**	274,14 ± 21,75**
Dose I	56,31 ± 12,19*	77,15 ± 22,66*
Dose II	28,18 ± 4,71	26,94 ± 12,42

10 ** p = 0.0005. Placebo vs. Tratado Dose II e Intactos. *p = 0.001 Dose I vs. Dose II e Intactos. Não existiram diferenças entre Intactos e Doses II. Prova de t de Student de duas filas.

Tabela 8. Nível de marcadores de estresse oxidativo nas mostras de fígado ao final da terceira semana de tratamento.

Grupos Experimentais	SODt	Catálase	HPT	MDA
Grupo Intacto	28261,08 ± 1260,94	14,84 ± 1,24	18,72 ± 3,22	0,09 ± 0,02
Grupo salina-placebo	289,2 ± 116,1**	560,59 ± 44,28**	257,84 ± 86,14**	0,56 ± 1,04 **
Grupo Dose I	17632,08 ± 321,55*	60,43 ± 11,81*	55,11 ± 2,77 0,16 ± 1,16*	
Grupo Dose II	20187,87 ± 245,13	22,67 ± 3,56	26,44 ± 2,43	0,09 ± 0,01

15 **p = 0.0002. Placebo vs. Tratados: Dose I e II e Intactos. *p = 0.0005 Dose I vs. Dose II, Placebo e Intactos. Não existiram diferenças entre Intactos e Doses II. Prova de t de Student de duas filas.

O tratamento com GHRP-6 demonstra a capacidade deste peptídeo para eliminar e controlar o depósito de material colágeno e de matriz extracelular em general no parênquima do fígado como consequência da administração reiterada de CCL4. O tratamento também demonstra prevenir a morte dos hepatócitos de forma individual, focal e pericentrolobulillar. A importância do tratamento se demonstra na convergência dos dados morfológicos, enzimáticos e bioquímicos que sustentam que apesar de haver se insaturado um estado de severo compromisso fibrótico difuso em forma de pontes confluentes, este pode ser levado a níveis desprezíveis sem recorrência. Novamente, destaca-se que os animais do grupo placebo não mostraram recuperação espontânea.

Exemplo 3. Reversão da fibrose renal ou Nefroesclerose em ratos. Terceiro experimento

O objetivo do presente experimento foi o de avaliar o efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP-6 na reversão da fibrose renal em ratos. Nesta ocasião o processo foi induzido pela administração contínua do agente anti-neoplásico doxorrubicina (DX) a uma dose de 2.5 mg/kg duas vezes por semana em espaço de 8 semanas. A presença de depósito fibrótico nos espaços peri-portais, peri-bronquiais e de todo o interstício renal com padrão quístico-nodular foi demonstrado por estudo histopatológico destes órgãos em 25% da população de ratos que tinha sido intoxicada com a doxorrubicina. A partir deste ponto, suspendeu-se a administração de DX e se iniciou o tratamento com a composição farmacêutica que contém GHRP-6. O tratamento foi realizado diariamente, com dose de 100 e 400µg/kg em um volume de 1 ml por via intraperitoneal, em espaço de 4 semanas. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais de 20 ratos cada um: (1) Grupo que recebe solução salina fisiológica-controle placebo. (2) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 100 µg/kg, (3) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 400 µg/kg. Concluídos os tratamentos os animais foram

sacrificados por sobre doses de anestesia e se procedeu à extração dos rins, o fígado, os pulmões e do soro sanguíneo. Os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina neutra e processados com as colorações de hematoxilina/eosina ou tricrômica de Masson para avaliação do processo de induração da fibrose. Outros fragmentos foram conservados a -70°C até seu processamento para determinar o conteúdo de hidróxi-prolina mediante hidrólise ácida em 1 N HCl, bem como os níveis de creatinina e de marcadores de estresse oxidativo. As determinações bioquímicas foram realizadas sobre a base do cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford.

Tabela 9. Número de animais por grupo em cada nível de severidade do compromisso fibrótico. Escala de gradação do processo fibrótico do rim: Grau (0) - Nula, Grau (1) - Moderada, interessa o interstício sem deformar ou encapsular os túbulos nem os glomérulos, Grau (2) - Intensa, interessa todo o interstício, deforma os túbulos, obliterando sua luz, encapsula o glomérulo externamente, Grau (3) - Muito intensa, interessa o interstício intensamente, encapsula e colapsa os túbulos, colapsa os glomérulos. Compreende o depósito a nível mesangial.

Grupo experimental (N=20)	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Placebo	0	1	4	15*
Dose I	6	9	5	0
Dose II	5	15*	0	0

* $p < 0.001$. Prova de Chi quadrado.

Tabela 10. Avaliação dos níveis de hidróxi-prolina nos rins ao final do tratamento.

Grupo experimental (20 fragmentos por grupo)	Conteúdo de OH-P ($\mu\text{g/g}$ de proteínas totais)
Placebo	$65,21 \pm 22,16^{**}$
Dose I	$46,15 \pm 2,73^{*}$
Dose II	$8,66 \pm 1,02$

** $p=0.0001$. Placebo vs. Tratados. * $p=0.05$ Dose I vs. Dose II. Prova de t de Student de duas filas.

Tabela 11. Níveis séricos de GOT e GPT nos grupos ao concluir o

tratamento. Integridade do parênquima hepático.

Grupo Experimental	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)
Placebo	124,12 ± 28,3**	188,77 ± 16,98**
Dose I	64,82 ± 23,71*	81,0 ± 10,25*
Dose II	26,22 ± 4,1	28,25 ± 5,66

** p=0.0005. Placebo vs. Tratados. *p=0.042 Dose I vs. Dose II Prova de t de Student de duas filas.

Tabela 12. Nível de marcadores de estresse oxidativo nas mostras de tecido renal ao final da quarta semana de tratamento.

Grupos Experimentais	SODt	Catálase	HPT	MDA
Grupo salina-placebo	199,7±6,81	356,2±18,15**	287,11±20,02**	0,981±1,1**
Grupo Dose I	665,08±28,42*	126,02±12,23*	73,2 ± 6,92	0,56±2,23*
Grupo Dose II	1287,64±112,63	45,38±8,27	16,14±3,67	0,087±0,02

** p=0.0002. Placebo vs. Tratados: Dose I e II. *p=0.033 Dose I vs. Dose II. Não existiram diferenças entre Intactos e Doses II. Prova de t de Student de duas filas.

Exemplo 4. Controle da fibrose do pulmão

O objetivo do presente experimento foi o de avaliar o efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP-6 na reversão da fibrose pulmonar em ratos. Nesta ocasião o processo foi induzido pela administração do agente anti-neoplásico Bleomicina (Ble) a uma dose de 2.5 U/kg duas vezes por semana em espaço de 4 semanas. A presença de fibrose nos pulmões foi demonstrada por estudo histopatológico destes órgãos em 25% da população de ratos que tinha sido intoxicada com a Ble. A partir deste ponto, suspendeu-se a administração de Ble e se iniciou o tratamento com a composição farmacêutica que contém GHRP-6. O tratamento foi realizado diariamente, a dose de 100 e 400µg/kg em um volume de 1 ml por via intraperitoneal, em espaço de 4 semanas. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais de 10 ratos cada um: (1) Grupo que recebe solução salina fisiológica-controle placebo. (2) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 100 µg/kg, (3) Grupo que recebe GHRP-6 com dose de 400 µg/kg. Concluídos os tratamentos, os animais foram sacrificados por

sobre doses de anestesia e procedeu à extração dos pulmões e do soro sanguíneo. Os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina neutra e processados com as colorações de hematoxilina/eosina ou tricrômica de Masson para avaliação do processo de induração da fibrose. Outros
 5 fragmentos foram conservados a -70°C até seu processamento para determinar o conteúdo de hidróxi-prolina mediante hidrólise ácida em 1 N HCl. As determinações bioquímicas foram realizadas sobre a base do cálculo de proteínas totais pelo método de Bradford.

A avaliação histológica da reação fibro-proliferativa no
 10 pulmão inclui o processo de fibrose perivascular, peribronquial, e séptico. O grau de fibrose pulmonar total foi estabelecido considerando a extensão e intensidade do processo nestes três segmentos para desta forma determinar a porcentagem de animais afetados ou não ao final do tratamento com o GHRP-6. Os resultados do número de animais por grupo com pulmões fibróticos de
 15 acordo com a sua severidade aparecem na tabela 1.

Grau 0- não evidências de fibroses ou somente finas fibras difusas ou de focos de material areolar que não sugerem comprometimento respiratório.

Grau 1- fibrose predominantemente peri-vascular em mais de
 20 75% das arteríolas e dos capilares.

Grau 2- fibrose predominantemente peri-vascular em mais de 75% das arteríolas e dos capilares, mais comprometimento peribronquial.

Grau 3- fibrose predominantemente peri-vascular em mais de 75% das arteríolas e dos capilares, mais comprometimento peribronquial. Já
 25 se constata a presença de material fibrótico nos septos interalveolares.

Tabela 13. Animais de cada grupo localizados segundo a severidade da fibrose pulmonar.

Grupo experimental (N=15)	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Placebo	0	1	5	10*
Dose I	3	10	2	0
Dose II	8	7	0	0

* $p < 0.05$. Prova exata de Fisher.

Como se pode observar, não existem animais no grupo placebo inclusos nas escalas Graus 0 e 1. A maioria destes se encontram no grupo Grau 3 de severidade. Contrariamente, a dose II mostra um potente efeito enquanto mais de 50% dos animais se localizam na escala Grau 0.

Tabela 14. Avaliação dos níveis de hidróxi-prolina nos pulmões ao final do tratamento com salina ou GHRP-6.

Grupo experimental (15 fragmentos por grupo)	Conteúdo de OH-P ($\mu\text{g/g}$ de proteínas totais)
Placebo	$178,53 \pm 42,77^{**}$
Dose I	$91,24 \pm 16,84^*$
Dose II	$12,75 \pm 3,61$

$^{**}p = 0.0001$. Placebo vs. Tratados. $^*p = 0.05$ Dose I vs. Dose II. Prova de t de Student de duas filas.

O efeito do tratamento na eliminação ou reversibilidade da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina se faz evidente também a partir da determinação do conteúdo de hidróxi-prolina em mostras secas de tecido pulmonar, o que converge com os resultados histológicos já descritos. Até o presente mostraram-se evidências do potente efeito antifibrótico da composição farmacêutica que contém GHRP-6 em quatro experimentos independentes em modelos experimentais que envolvem: dois estudos de fibroses do fígado, um estudo de fibrose do rim e um estudo de fibrose do pulmão. Os resultados são repetíveis e reproduzíveis, o que indica a eficácia do tratamento no controle destes processos em mais de um órgão interno, e independentemente da base etio-patogênica que lhe deu origem.

Exemplo 5. Efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP-6 no controle e eliminação da acumulação de proteína beta-amilóide no cérebro

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a influência da administração prolongada (8 semanas) de GHRP-6 sobre marcadores bioquímicos e morfológicos cerebrais, indicadores da progressão do dano no

sistema nervoso central, em ratos transgênicos para a proteína precursora do beta-amilóide.

Para o presente estudo adquiriram ratos transgênicos APP que sobre-expressam a proteína precursora do beta amilóide; de sexo masculino e de 20-25 gramas de peso. Os animais (N=30) foram aleatoriamente distribuídos a:

Grupo placebo - com solução salina fisiológica 0.9%.

Grupo Dose I - GHRP-6 a 50 µg/kg de peso em solução salina.

Grupo Dose II - GHRP-6 a 100 µg/kg de peso em solução salina.

Os tratamentos foram realizados por via intra-peritoneal em um volume de 1 ml, cinco dias na semana e em espaço de 8 semanas, de tal forma que os animais receberam 40 administrações de GHRP-6. Sobre a experiência de estudos piloto exploratórios sabia-se que este lapso de tempo de tratamento era suficiente para melhorar habilidades cognitivas e motoras dos animais em condições de estresse.

Concluídas as 8 semanas de tratamento, os ratos foram sacrificados por sobre-doses de anestesia e pré-fundidos *in-situ* com solução salina. Os encéfalos foram extraídos e um hemisfério cerebral foi congelado em gelo seco e o contralateral fixado em uma solução a 4% de paraformaldeído neutro. As mostras foram submetidas a criocortes de 10 micros e coloridas com H/E, Vermelho Congo ou incubadas com um anticorpo que reconhece especificamente o beta-amilóide. Os processos morfométricos foram realizados capturando a imagem microscópica com uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio, sendo analisada pelo programa DIGIPAT.

Indicadores estudados

Número de depósitos fibrilares de proteína beta-amilóide positivos ao vermelho congo.

Número de focos imunorreativos com o anticorpo que

reconhece à proteína beta-amilóide.

Tamanho das placas amilóides no cérebro reconhecidas a 200 e 400x (em micros quadrados).

Concentração cerebral de mio-inositol como indicador de velhice e deterioração do metabolismo cerebral ($\mu\text{mol/grama}$ de tecido).

Marcadores de estresse oxidativo no cérebro.

Tabela 15. Efeito do tratamento com GHRP6 na remoção dos depósitos amilóides cerebrais.

Grupo Experimental	No. de depósitos positivos para Vermelho Congo	No. de depósitos positivos para beta-amilóide	Tamanho das placas de amilóide	Concentração de mio-inositol no cérebro.
Placebo	$35,64 \pm 11,33^{**}$	$31,27 \pm 8,9^{**}$	$48,5 \pm 2,03^{**}$	$61,28 \pm 16,33^{**}$
Dose I. GHRP6	$21,78 \pm 6,57^{*}$	$15,11 \pm 3,27$	$15,51 \pm 6,44$	$49,35 \pm 10^{*}$
Dose II. GHRP6	$14,52 \pm 4,18$	$13,58 \pm 4,61$	$10,88 \pm 4,1$	$27,45 \pm 8,61$

****** $p=0.0001$. ***** $p=0.0023$. Prova de Ou Mann Whitney.

Na tabela 15 recopilam-se todos os resultados dos parâmetros estudados para caracterizar o efeito do tratamento a longo prazo com a composição farmacêutica que contém GHRP-6. Note-se que os resultados se referem ao contagem de imagens digitais de um só hemisfério cerebral. Para salvar esta limitação as contagens foram realizadas às cegas por três observadores diferentes e os resultados que mostrados correspondem a 5 leituras das lâminas. Tabela 15. Efeito da composição farmacêutica que contém GHRP-6 no controle da acumulação de amilóide e a bioquímica cerebral.

Como se pode observar o tratamento por 8 semanas com a composição farmacêutica que contém GHRP-6 tem um favorável no controle da acumulação de material amilóide em suas diversas formas no cérebro, bem como na correção do metabolismo do órgão. Existe um marcado efeito dado pela redução dos depósitos amilóides, e redução do corte das placas. O marcado efeito de redução da acumulação de mio-inositol estabelece a evidência de uma correção de rotas bioquímicas, de maior assimilação da energia, e de melhor nutrição dos neurônios. Isso pode ter um favorável

impacto clínico no controle do envelhecimento cerebral. A seguir na tabela 16, demonstra-se o favorável efeito da composição farmacêutica que contém GHRP-6 no controle da peroxidação dos lipídeos no cérebro de animais transgênicos para a doença de Alzheimer. Novamente estas evidências sugerem o efeito favorável desta composição para controlar um dos processos mais responsabilizados com a deterioração do tecido nervoso nas doenças e durante o envelhecimento.

Tabela 16. Marcadores do estresse oxidativo em tecido cerebral.

Grupos Experimentais	SODt	Catálase	HPT	MDA
Grupo salina-placebo	475,9 ± 60,32**	118,6 ± 26,33**	105,6 ± 22,1**	1,232 ± 1,14 **
Grupo Dose I	611,17 ± 44,79*	81,6 ± 15,25	54,3 ± 11,87*	0,77 ± 1,56*
Grupo Dose II	863,22 ± 50,3	60,18 ± 13,67	21,25 ± 5,44	0,4 ± 0,02

p = 0.00014. Placebo vs. Tratados: Dose I e II. *p=0.025 Dose I vs. Dose II.

Prova de U-Mann Whitney.

Exemplo 6. Efeito da composição farmacêutica baseada em GHRP- 6 e outros peptídeos para o controle da demência de origem vascular. Eliminação do material osmiofílico da vasculatura cerebral. Prevenção e controle do processo de envelhecimento cerebral.

Este experimento foi realizado com o propósito de avaliar a eficácia de composições farmacêuticas que indistintamente contêm algum dos seguintes peptídeos: GHRP-6, GHRP-2, hexarelina, grelina, sobre o controle do processo de involução neuro-funcional central em animais transgênicos que sobre-expressam uma forma mutada do gene NOTCH 3 nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos. Com o transcurso dos meses estes animais desenvolvem uma arteriopatia similar à que aparece na doença CADASIL referida na memória descritiva, e que acontece como uma das principais causas de demência vascular. As lesões vasculares nestes animais também incluem as vasculopatias retinocerebrais, cerebrais e da cóclea. Desde o ponto de vista histopatológico se destaca a presença de material amilóide no cérebro e nos vasos sanguíneos, o depósito de material granular osmiofílico nas paredes arteriais do cérebro e nas meninges, bem como a

redução de sua luz. No cérebro e nos principais troncos nervosos aparecem zonas branco-pálidas, zonas de microinfartes e focos hemorrágicos.

Utilizaram-se ratos macho de 18-20 meses de idade quando já tinham evidências sintomatológicas da doença. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais e de tratamento:

A - grupo placebo que recebeu solução salina fisiológica.

B - grupo tratado com 100 µg/kg de GHRP-6.

C - grupo tratado com 100 µg/kg de GHRP-2.

D - grupo tratado com 100 µg/kg de Grelina.

E- grupo tratado com 100 µg/kg de Hexarelina.

Os tratamentos foram efetuados duas vezes na semana e em espaço de 16 semanas, via intraperitoneal. Concluídos os tratamentos, independentemente da melhoria clínica evidenciada em numerosos animais tratados, procedeu-se a estudo de autópsia e à tomada de mostras de tecido cerebral com as meninges para determinações histopatológicas e bioquímicas. Os animais receberam uma overdose de anestesia, foram pré-fundidos com solução salina fisiológica fria por via intracardíaca para arrastar o sangue do encéfalo. Os encéfalos foram extraídos e um hemisfério cerebral foi congelado em gelo seco e o contralateral fixado em uma solução a 4% de paraformaldeído neutro. As amostras foram submetidas a criocortes de 10 micros e coloridas com H/E, Vermelho Congo ou incubadas com um anticorpo que reconhece especificamente o beta-amilóide. Os processos morfométricos foram realizados capturando a imagem microscópica com uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio, sendo analisada pelo programa DIGIPAT.

Indicadores estudados:

Número de depósitos fibrilares de proteína beta-amilóide nos vasos sanguíneos.

Número de enfartes subcorticais.

Número de hemorragias subcorticais.

Concentração cerebral de mio-inositol como indicador de velhice e deterioração do metabolismo cerebral ($\mu\text{mol/grama}$ de tecido).

5 Marcadores de estresse oxidativo no cérebro.

Tabela 17. Resultados das determinações morfométricas sobre o tecido cerebral.

Grupo Experimental	No. de depósitos positivos para Vermelho Congo	No. de depósitos positivos para Nissl	No. de infartos subcorticais	No. de focos hemorrágicos
Placebo	35,64 $\pm$ 11,33**	31,27 $\pm$ 8,9**	48,5 $\pm$ 2,03**	41,28 $\pm$ 16,33**
GHRP-6	16,31 $\pm$ 5,33	14,22 $\pm$ 8,15	26,79 $\pm$ 4,19	19,05 $\pm$ 5,14
GHRP-2	18,26 $\pm$ 4,57	13,8 $\pm$ 6,76	30,13 $\pm$ 5,72	11,79 $\pm$ 4,25
Grelina	17,67 $\pm$ 2,26	11,27 $\pm$ 4,61	26,9 $\pm$ 4,27	13,06 $\pm$ 2,77
Hexarelina	15,24 $\pm$ 1,24	11,36 $\pm$ 6,4	27,11 $\pm$ 3,55	14,61 $\pm$ 3,31

** $p < 0.0002$ entre o placebo e o resto dos grupos de tratamento com as substâncias de cada uma das composições farmacêuticas.

10 Como se pode observar o tratamento com cada um dos secretagogos reduz significativamente o número de artérias, arteríolas e capilares positivos a amiloide fibrilar (vermelho congo) e os depósitos granulares de material osmiofilico (coloração de Nissl). Conseqüentemente, a presença de microinfartos subcorticais que constituem a leucoencefalopatia, bem como o número de focos hemorrágicos também aparecem
15 significativamente diminuídos em cada um dos tratamentos com as composições.

Tabela 18. Indicadores do estresse oxidativo em tecido cerebral.

Grupos Experimentais	SODt	Catálase	HPT	MDA	Mio-iositol cerebral
Grupo de solução salina	360,9 $\pm$ 42,48**	274,6 $\pm$ 30,14**	265,4 $\pm$ 18,7**	0,984 $\pm$ 0,04**	44,2 $\pm$ 10,08**
GHRP-6	12327,31 $\pm$ 55,1	51,5 $\pm$ 16,01	101,7 $\pm$ 22,09	0,23 $\pm$ 0,05	12,36 $\pm$ 5,64
GHRP-2	11065,49 $\pm$ 46,29	48,23 $\pm$ 14,25	117 $\pm$ 13,55	0,302 $\pm$ 0,01	14,65 $\pm$ 4,38
Grelina	12290,9 $\pm$ 60,32	44,67 $\pm$ 11,58	142,16 $\pm$ 10,01	0,261 $\pm$ 0,003	14,04 $\pm$ 3,85
Hexarelina	10814,68 $\pm$ 33,08	51,19 $\pm$ 7,84	54,3 $\pm$ 11,87	0,284 $\pm$ 0,01	11,88 $\pm$ 2,71

20 ** significa diferença de $p < 0.01$ entre os animais do grupo placebo que receberam solução salina fisiológica e o resto dos grupos que foram tratados com as composições farmacêuticas individuais que contêm os peptídeos.

O efeito dos peptídeos se faz muito evidente também ao estudar o processo de peroxidação de lipídeos no cérebro dos animais transgênicos modelo da doença humana CADASIL.

5 Como ocorre com a redução dos danos vasculares e dos enfartes, os peptídeos secretagogos aqui estudados mostram a capacidade de reduzir ou atenuar a neuro-toxicidade que é provocada pela alta produção de espécies reativas de oxigênio, presentes na doença humana, e constatada além disso nos animais que só recebem solução salina. Este efeito, estende o conceito de neuro-proteção geral destas substâncias a contextos nos quais o
10 envelhecimento cerebral se encontra mediado por danos vasculares e de peroxidação lipídica excessiva.

Exemplo 7. Efeito dos peptídeos GHRP-6, GHRP-2, Hexarelina e/ou Grelina na eliminação dos depósitos patológicos de material fisiológico da pele.

15 Para estudar o efeito dos peptídeos GHRP-6, GHRP-2, Hexarelina e/ou Grelina na eliminação dos depósitos patológicos de material fisiológico da pele, fragmentos de quelóides de origem humana foram xenotrasplantados a ratos atímicos na região dorsal. Decorridas 72 horas de evolução, que permitiram corroborar o enxerto e a viabilidade dos
20 xenoenxertos, os animais (N=6) foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos de tratamento

A- GRUPO CONTROLE SALINO (VEÍCULO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS).

B- GRUPO QUE RECEBE GHRP6

25 C- GRUPO QUE RECEBE GHRP2

D- GRUPO QUE RECEBE HEXARELINA E- GRUPO QUE RECEBE GRELINA

Os tratamentos foram realizados uma vez a cada 24 horas, por um período de 7 dias. As substâncias foram infiltradas nas bordas dos

implantes, produzindo a biodisponibilidade local dos princípios ativos na zona, a dose desde 1 miligrama a 5 microgramas. Decorrido o período de tratamento, os animais foram sacrificados, e os implantes extraídos para avaliação da resposta farmacológica de cada substância. As mostras foram fragmentadas para estudo histológico e determinações bioquímicas de colágeno, depois de serem pesadas. Os fragmentos para estudo histológico foram fixados em formalina neutra a 10% e os dedicados a bioquímica foram conservados a -70 graus centígrados. Os parâmetros estudados foram:

a- Peso úmido de cada enxerto coletado,

b- Conteúdo de hidróxi-prolina no tecido.

c- Número de campos microscópicos com clara positividade do tecido às colorações histológicas de Vermelho Pricosírio, e tricrômica de Masson. As amplitudes empregadas foram x 4 e x 10. Os dados de cada ampliação foram promediado.

d- Número de mastócitos por campo microscópico - positivos à coloração de azul de anilina. A amplitude empregada foi x 20.

Como ilustrado na tabela 19, todos os peptídeos estudados exerceram um significativo efeito antifibrótico ao se comparar com os animais que receberam veículo como controle.

Tabela 19. Efeito antifibrótico dos tratamentos em pele.

Grupo de tratamento	Peso úmido (g)	Teor de hidroxiprolina (µg/g)	No. de campos positivo para as colorações para colágeno	No. de campos microscópicos com células indutoras (mastócitos)
Controle de solução salina	13,55± 2,31	258,61± 12,53	37,2± 22,44	25,31± 6,18
GHRP6	6,71± 1,18a	88,27± 4,61	11,45± 5,98	9,54± 2,15
GHRP2	7,14± 1,02a	84,17± 7,75	18,12± 6,75	11,17± 3,33
Hexarelina	6,25± 1,73a	88,59± 6,58	12,35± 8,94	10,18± 2,98
Grelina	6,67± 1,53a	85,23± 4,11	11,27± 4,67	10,71± 4,57

(a) Significa diferença significativa de $p < 0.01$ entre os grupos que receberam os peptídeos e o controle salino de veículo. Teste t de duas extremidades.

Resulta evidente que cada um dos peptídeos às doses ensaiadas exerce um potente efeito antifibrótico no sistema experimental estabelecido,

- caracterizado por ser agudo, reduzir rapidamente o excesso de material colágeno e de matriz extracelular, reduzir o número de células indutoras (mastócitos) e de efectoras (fibroblastos e miofibroblastos). É notório que a partir da terceira infiltração com qualquer dos peptídeos ensaiados os
- 5 implantes mostram uma marcada redução do tamanho e começam a tornar-se pálidos e desvitalizados.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que contém peptídeos secretagogos e é capaz de prevenir, controlar e eliminar os depósitos patológicos de material fibrótico e o excesso de matriz extracelular dos órgãos internos e da pele do receptor.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que elimina os depósitos intracelulares e extracelulares de material hialino, amilóide, formas granulares de material eosinofílico e/ou osmiofílico de órgãos internos, externos e da rede vascular.

3. Composição de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pelo fato de que é para restaurar a funcionalidade normal de qualquer órgão ou tecido interno ou externo que tenha sido afetado por depósitos excessivos de material fibrótico, amilóide, osmiofílico, eosinofílico ou hialino.

4. Composição de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais.

5. Composição de acordo com as reivindicações 1-4, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por rota parenteral, podendo ser intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intratecal, e infiltração local na pele, sobre mucosas, epitélios ou órgãos ou mais especificamente dentro de suas lesões.

6. Composição de acordo com as reivindicações 1-4, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, em que a composição é administrada por via retal.

7. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais por via tópica em forma líquida, de compressas, formulações semi-sólidas ou sólidas.

8. Composição de acordo com as reivindicações 1-6,

caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico e excesso de matriz extracelular de qualquer etiopatogenia no fígado como seqüela de hepatites virais, alcoolismo, intoxicações, autoimunes ou idiopáticas em geral.

9. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico e excesso de matriz extracelular em órgãos como os pulmões podendo ser de origem tóxica, profissional, medicamentosa, radioativa, autoimune, seqüela de asma, alergias ou idiopática em geral.

10. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro-hialino, ou amilóideo e o excesso de matriz extracelular em órgãos como os rins podendo ser a nefro-esclerose ou e/ou a túbulo-esclerose de origem diabética, tóxica, profissional, medicamentosa, autoimune, idiopática em geral ou seqüela de infecções repetidas.

11. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro-hialino, ou amilóideo e o excesso de matriz extracelular na pele, podendo ser de origem autoimune, idiopática em geral.

12. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 7, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro-hialino, ou amilóideo e o excesso de

matriz extracelular na pele, podendo tratar-se especificamente de quelóides, cicatrizes hipertróficas ou outras formas de cicatrizes exuberantes.

13. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 7, capaz de corrigir a aparência estética da pele em cirurgias reconstrutivas, estéticas ou similares.

14. Uso de peptídeo GHRP-6 de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizado pelo fato de que é para a manufatura de uma composição farmacêutica para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 7 para eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro- hialino, ou amilóideo e o excesso de matriz extracelular na pele, podendo tratar-se especificamente de seqüelas fibróticas de acne em qualquer de suas formas.

15. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro-hialino, ou amilóideo e o excesso de matriz extracelular no pâncreas, e o tubo digestivo desde o esôfago até o reto.

16. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de material fibrótico, fibro-hialino, ou amilóideo e o excesso de matriz extracelular em toda a rede vascular.

17. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de amilóideo e/ou hialino, e/ou de material granular osmiofilico ou eosinofilico no cérebro e suas células.

18. Composição de acordo com as reivindicações 1-6,

caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de amilóideo e/ou hialino, e/ou de material granular osmiofílico ou eosinofílico na rede de vasos do organismo, incluídos os do sistema nervoso central e as meninges.

19. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de reduzir e/ou prevenir o depósito de material fibrótico, amilóideo e/ou hialino, e/ou de granular osmiofílico e/ou eosinofílico nas paredes dos vasos sanguíneos em geral.

20. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de eliminar os depósitos de amilóideo e/ou hialino, e/ou de material granular osmiofílico ou eosinofílico, de nervos craniais, extra-craniais, sensitivos, motores, mistos e/ou do sistema neurovegetativo.

21. Composição de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizada pelo fato de que é para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6, capaz de reduzir e/ou prevenir o depósito de material fibrótico, amilóideo e/ou hialino, e/ou de granular osmiofílico e/ou eosinofílico nas paredes dos vasos sanguíneos em geral.

22. Composição de acordo com as reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que contém um ou vários dos seguintes componentes GHRP-6, ou GHRP-2, ou Ghrelina, ou Hexarelina, é capaz de deter e controlar o processo de excessiva peroxidação de lipídeos e de estresse oxidante em células, tecidos e órgãos sistêmicos para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6.

23. Composição de acordo com as reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que é capaz de deter e controlar o processo de excessiva peroxidação de lipídeos e de estresse oxidante; particularmente no sistema nervoso central e os nervos periféricos, para ser administrada a

5 pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6.

24. Uso de peptídeos GHRP-6, ou GHRP-2, ou Ghrelina, ou Hexarelina, caracterizado pelo fato de que é em uma composição farmacêutica útil para deter e controlar o processo de envelhecimento cerebral e a deterioração de suas funções dados por excessiva peroxidação de lipídeos e de estresse oxidante; assim como por dano de seu sistema vascular, para ser

10 administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6.

25. Uso de peptídeos GHRP-6 ou GHRP-2, ou Ghrelina, ou Hexarelina de acordo com as reivindicações 1-6, caracterizado pelo fato de que é para a manufatura de uma composição farmacêutica útil para deter e controlar o processo de envelhecimento cerebral e a deterioração de suas

15 funções dados por excessiva peroxidação de lipídeos e de estresse oxidante; assim como por dano de seu sistema vascular, para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6.

26. Uso de peptídeos GHRP-6, ou GHRP-2, ou Ghrelina, ou Hexarelina, caracterizado pelo fato de que é para a manufatura de uma composição farmacêutica útil para deter e controlar o processo de acumulação de materiais amilóideos e/ou hialinos, e/ou granular osmiofílico ou eosinofílico nas células e o espaço extracelular do tecido do sistema nervoso

20 central e periférico e para ser administrada a pacientes ou animais, por qualquer das vias descritas nas reivindicações 5 e 6.

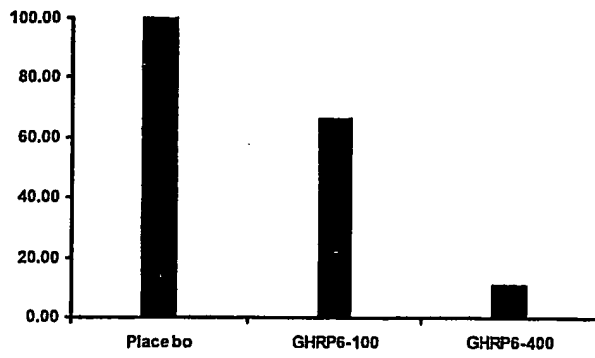


FIGURA 1

RESUMO**“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE PEPTÍDEOS”**

A presente invenção se relaciona com o uso de peptídeos secretagogos os quais administrados em uma composição farmacêutica de forma reiterada previnem e eliminam os depósitos de material fibrótico patológico em tecidos parenquimatosos internos como fígado, pulmões, esôfago, intestino delgado, rins, vasos sanguíneos, articulações, além de formas sistêmicas de fibrose cutânea de qualquer etiopatogenia. Adicionalmente estes peptídeos impedem e eliminam o depósito de material amilóideo e hialino em qualquer de suas formas químicas e manifestações tecidulares; entre outras do cérebro, cerebelo, vasos sanguíneos, fígado, intestinos, rins, baço, pâncreas, articulações, e a pele. Desta forma corrige-se a disfunção de células, tecidos e órgãos afetados por estes depósitos anormais. Os peptídeos da presente invenção administrados por infiltração ou tópicos contribuem a prevenir e eliminar os quelóides e as cicatrizes hipertróficas na pele por seqüelas de queimaduras, e outros traumas cutâneos.