

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.02.11	(73) Titular(es): BIOTEMPT B.V.	
(30) Prioridade(s): 2007.02.12 US 901155 P 2007.07.23 US 961841 P	KNEUTERDIJK 2 2514 EN DEN HAAG	NL
(43) Data de publicação do pedido: 2009.11.25	(72) Inventor(es): ROBBERT BENNER	NL
(45) Data e BPI da concessão: 2014.01.29 084/2014	NISAR AHMED KHAN	NL
	(74) Mandatário: ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA	
	AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO D A HEMORRAGIA TRAUMÁTICA COM OLIGOPÉPTIDOS CURTOS**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS MÉTODOS E MEIOS ASSOCIADOS PARA TRATAR UM SUJEITO, POR EXEMPLO UM MAMÍFERO, EM CHOQUE HEMORRÁGICO OU QUE SE CONSIDERE ESTAR EM RISCO DE CHOQUE HEMORRÁGICO. ESTES MÉTODOS INCLUEM ADMINISTRAR AO SUJEITO, DE FORMA CLINICAMENTE ACEITÁVEL, UM OLIGOPÉPTIDO CURTO COMO AQGV E/OU LQGV.

DESCRIÇÃO

«TRATAMENTO DA HEMORRAGIA TRAUMÁTICA COM OLIGOPÉPTIDOS CURTOS»

CAMPO TÉCNICO

[0001] A invenção refere-se no geral ao campo da biotecnologia e da medicina.

ANTECEDENTES

[0002] Os traumatismos são a quinta principal causa de morte a nível mundial e irão tornar-se na segunda principal causa em 2020. Neste momento, já são a principal causa de morte em indivíduos com idades compreendidas entre 5 e 45 anos. Traumatismos decorrentes de acidente de viação, traumatismos auto-inflingidos, violência interpessoal (incluindo guerra), acidentes de trabalho, quedas, queimaduras e desastres ambientais contribuem todos para tal.

[0003] A prevenção primária é a forma mais eficaz de limitar os traumatismos. Nunca é demais enfatizar a importância da educação, dos controlos técnicos e da legislação na área da prevenção de traumatismos. Praticamente o mesmo número de indivíduos morre em acidentes de viação no Egipto e nos EUA, mas o Egipto tem um quarto da população e um décimo dos veículos dos EUA. Não obstante, a maioria dos traumatismos em ambos os países é evitável.

[0004] A prevenção secundária, a aplicação de cuidados

intensivos para evitar a morte e incapacidade após o traumatismo, é também altamente eficaz. O custo dos cuidados em traumatologia por ano de vida poupado ajustado à qualidade é baixo comparativamente a tratamentos noutras categorias de doenças comuns, tais como a doença cardiovascular, AVC, ou a terapêutica oncológica. Estes cuidados são preferencialmente dispensados em instalações regionais. Os maiores centros de traumatologia de Nível 1 tipicamente efectuem mais de 5000 internamentos anualmente e contam com cirurgiões de traumatologia, neurocirurgiões, ortopedistas, anestesistas e um amplo grupo de pessoal de apoio 24 horas por dia. O trabalho destes centros no tratamento dos doentes, educação médica e desenvolvimento de novo conhecimento está a originar uma revolução internacional na qualidade dos cuidados traumatológicos.

[0005] A cada ano, 1 em 7 americanos sofre um traumatismo significativo. Dois terços destes, ou 1 pessoa em cada 10 da população dos EUA, procura cuidados médicos para esse traumatismo e 1 em cada 100 americanos é admitido num hospital para cuidados de traumatologia anualmente. Cerca de 1 em cada 10 doentes internados por traumatismo, ou 1 em cada 1000 americanos, recebe produtos sanguíneos no curso dos cuidados traumatológicos. Estes indivíduos recebem 10% a 15% de todo o sangue transfundido nos EUA.

[0006] Hemorragia grave e choque hemorrágico são causas comuns de morbilidade e mortalidade em doentes criticamente doentes nos cuidados intensivos. Os doentes em choque apresentam compromisso da macrocirculação e da microcirculação em vários tecidos. O compromisso da perfusão esplâncnica desempenha um papel importante no

desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos induzida por translocação bacteriana intensificada a partir dos intestinos e activação de uma cascata inflamatória exacerbada. A redução na perfusão esplâncnica também leva à redução do fornecimento sanguíneo aos órgãos a jusante, como o fígado, originando disfunção hepática, que também contribui para a falência de múltiplos órgãos após o choque.

[0007] Cerca de 156.000 pessoas morrem de lesões anualmente nos EUA, e 93.000 dessas fatalidades envolvem trauma físico. Metade destes indivíduos morre antes de chegar ao hospital. Entre os que conseguem chegar ao hospital vivos e que morrem durante esse internamento hospitalar, 80% morre nas primeiras 24 horas após a admissão. As causas de morte mais frequentes de doentes que morrem no local ou no hospital são a lesão neurológica profunda e a hemorragia descontrolada.

[0008] O controlo da hemorragia é um aspecto crítico dos cuidados em traumatologia. No local, ligaduras, pressão directa e torniquetes controlam a hemorragia superficial e das extremidades. No hospital, a imagiologia de diagnóstico e a exploração cirúrgica permitem a identificação rápida da maior parte dos restantes pontos de hemorragia. Contudo, a identificação de locais lesionados não permite sempre um controlo imediato da hemorragia. Lesões tais como lacerações hepáticas profundas e fracturas pélvicas com ruptura do plexo venoso pélvico frequentemente requerem acondicionamento, e o controlo de hemorragia é obtido apenas lentamente. Estas lesões podem resultar em hemorragia extensiva e prolongada mesmo no hospital.

[0009] Os padrões da utilização de sangue após lesão traumática são determinados pelos padrões da lesão, a velocidade de transporte para os cuidados cirúrgicos, e a disponibilidade de recursos no centro cirúrgico. No ano 2000, no R. Adams Cowley Shock Trauma Center da Universidade de Maryland, em Baltimore, 91% dos 5649 doentes admitidos vindos directamente do local do acidente não receberam produtos sanguíneos. Cerca de dois terços dos restantes 332 doentes receberam 10 U de eritrócitos (Ec.) ou menos. Contudo, 75% dos Ec. administrados foram fornecidos aos 146 doentes que receberam mais de 10 U e 50% de todos os Ec. usados foram administrados a 68 doentes, que receberam mais de 20 U de Ec.. Assim, apenas um grupo seleccionado de doentes de traumatologia recebeu transfusões, e são estes doentes que estão a mudar o nosso conceito acerca da utilização de sangue e reanimação, e é para o tratamento destes que se direcciona esta invenção.

[0010] Os critérios decisivos para a decisão de reanimar ou efectuar uma transfusão de sangue a um doente em situação de trauma-hemorragia são diversos e complexos (ver, por exemplo Critical Care, Management of Bleeding Following Major Trauma: a European Guideline, publicado a 04/02/2007, Donat R. Spahn; Vladimir Cerny; Timothy J. Coats; Jacques Duranteau; Enrique Fernandez-Mondéjar; Giovanni Gordini; Philip F. Stahel; Beverley J. Hunt; Radko Komadina; Edmund Neugebauer; Yves Ozier; Louis Riddez; Arthur Schultz; Jean-Louis Vincent; Rolf Rossaint, <http://www.medscape.com/viewarticle/5540581>), contudo, em determinado momento é decidido se e como proceder à reanimação, fornecendo Ec. ou plasma, plaquetas ou outros produtos sanguíneos a estes

doentes.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0011] Aqui determinamos se a administração de oligopéptidos curtos tem efeito nos parâmetros funcionais imunitários nocivos após trauma-hemorragia.

[0012] Aqui são divulgados métodos e meios associados de tratamento de um sujeito (e.g., um mamífero, por exemplo humano) em choque hemorrágico ou que se considere estar em risco de choque hemorrágico. Tais métodos incluem administrar ao sujeito de forma clínica ou farmacologicamente aceitável um oligopéptido curto, como AQGV e/ou LQGV. Assim, a invenção refere-se ao uso de pelo menos um tetrapéptido isolado ou sintético seleccionado do grupo composto por LQGV, AQGV e LAGV e derivados funcionais destes, em que um resíduo de L-aminoácido é substituído por um D-aminoácido, ou um sal de adição ácido ou básico farmacologicamente aceitável destes, para produção de uma composição farmacêutica para o tratamento de um sujeito a sofrer ou que se considere estar a sofrer de trauma-hemorragia. O referido péptido sendo identificado, de preferência, através do teste a pelo menos um péptido isolado ou sintético num modelo animal experimental de trauma-hemorragia e da demonstração de que a administração do referido péptido de teste após indução de trauma-hemorragia reduz o nível plasmático de pelo menos uma citocina pró-inflamatória (por exemplo, TNF-alfa ou IL-6, como aqui fornecido) num animal sujeito a trauma-hemorragia, quando comparado com um animal sujeito a trauma-hemorragia que não recebeu um

péptido de teste. O referido péptido consiste em 4 aminoácidos seleccionados do grupo composto por AQGV, LQGV ou LAGV. É igualmente fornecido tratamento com misturas de péptidos, que compreendem pelo menos um péptido seleccionado do grupo composto por AQGV, LQGV ou LAGV e um outro péptido. Um outro péptido preferido é seleccionado de entre os capazes de reduzir os níveis de citocina pró-inflamatória num modelo animal de trauma-hemorragia ou choque hemorrágico, como um fornecido aqui. Numa modalidade preferida da invenção, o referido tratamento de trauma-hemorragia ou choque hemorrágico também compreende fornecer (por reanimação ou transfusão) ao referido sujeito sangue ou produtos sanguíneos, tais como eritrócitos (Ec.), plaquetas, plasma ou combinações destes.

[0013] É igualmente descrito um método para identificar um péptido ou um análogo funcional ou derivado destes, para uso na produção de uma composição farmacêutica para o tratamento de um sujeito a sofrer ou suspeito de estar a sofrer de trauma-hemorragia, compreendendo testar pelo menos um péptido sintético ou isolado com menos de 30 aminoácidos num modelo animal experimental de trauma-hemorragia e demonstrando que a administração do referido péptido de teste após indução de trauma-hemorragia reduz o nível plasmático de pelo menos uma citocina pró-inflamatória num animal sujeito a trauma-hemorragia, quando comparado com um animal sujeito a trauma-hemorragia que não recebeu um péptido de teste. É preferível testar o péptido de teste através de um método em que é igualmente fornecido ao referido animal sujeito a trauma-hemorragia sangue ou produtos sanguíneos, tais como eritrócitos (Ec.), plaquetas, plasma ou combinações

destes. É igualmente descrita a selecção do referido péptido de teste capaz de reduzir os níveis de citocina pró-inflamatória pretendida para uso na produção de uma composição farmacêutica, em particular em que a referida composição farmacêutica é produzida para o tratamento de um sujeito a sofrer ou suspeito de estar a sofrer de choque hemorrágico por trauma-hemorragia.

[0014] No choque hemorrágico há uma perda de sangue massiva, que não é possível compensar pelo corpo sem tratamento. O tratamento primário do choque hemorrágico é controlar a hemorragia e restabelecer o volume intravascular para melhorar a perfusão de tecido. Este tratamento induz uma resposta inflamatória, que pode culminar numa resposta inflamatória grave e finalmente em síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO).^[1,2,3] Adicionalmente, aproximadamente 40% dos doentes desenvolve sépsis em resultado de trauma-hemorragia.^[3] Sépsis e SDMO são as principais causas de morte em doentes gravemente afectados nas unidades de cuidados intensivos em todo o mundo, com taxas de mortalidade de cerca de 50%.^[4,5]

[0015] A resposta inflamatória grave devida a trauma-hemorragia é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), em células endoteliais sinusoidais e hepatócitos. Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias são encontrados sistemicamente e localmente no fígado, pulmões e intestinos.^[6,7,8,9] As citocinas pró-inflamatórias produzidas são em particular o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina

(IL)-1 β e IL-6.^[10, 11, 12] Estas citocinas afectam a integridade/função do órgão directamente, mas também indirectamente através de mediadores secundários, tais como óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, factor de activação de plaquetas, prostaglandinas e complemento.^[13, 14] TNF- α causa igualmente a libertação de factor tecidual pelas células endoteliais levando a deposição de fibrina e coagulação intravascular disseminada.^[15, 16] As células hepáticas, principalmente células Kupffer, mas igualmente hepatócitos e células endoteliais sinusoidais, são consideradas como os produtores principais destas citocinas pró-inflamatórias no decurso de choque hemorrágico.^[17] Um equilíbrio delicado entre vasodiladores e vasoconstritores mantém a perfusão esplâncnica. Tem sido observada a produção sistémica aumentada de vasoconstritores, como epinefrina, angiotensina II, endotelina e tromboxano A₂ em modelos experimentais de trauma-hemorragia e sépsis. Estes vasoconstritores não contribuem apenas para o aumento da resistência periférica total, mas actuam igualmente nos vasos esplâncnicos e reduzem a sua taxa de perfusão. A produção reduzida de vasodilatadores ou a resposta atenuada do vaso esplâncnico aos vasodilatadores (disfunção endotelial) é igualmente observada após choque hemorrágico grave. Estes dois factores contribuem para o distúrbio circulatório. Adicionalmente, estes efeitos induzem hipoxia intestinal, reduzem o fornecimento de nutrientes, aumentam a produção de radicais livres de oxigénio e aumentam a acumulação de neutrófilos, originando lesões na barreira da mucosa intestinal e, assim, resultando no aumento da translocação bacteriana.

[0016] Na última década, os investigadores têm-se focado na modulação das respostas inflamatórias sistémicas com agentes terapêuticos destinados a neutralizar a actividade das citocinas, especialmente $\text{TNF-}\alpha$.^[18] Outros investigadores usaram agentes terapêuticos dirigidos à inibição da produção de $\text{TNF-}\alpha$.^[19] Contudo, a maior parte destes agentes terapêuticos deve ser administrada antes do início do choque hemorrágico para obter um efeito terapêutico.^[19] Claramente, isto é quase impossível numa situação de trauma-hemorragia clínica. Assim, as terapias iniciadas após o início de trauma-hemorragia grave e destinadas a reduzir a produção de citocina pró-inflamatória são mais relevantes para prevenir os acontecimentos que levam a SDMO.

[0017] Durante a gravidez, o sistema imunitário materno tolera o feto reduzindo a resposta imunitária mediada por células, ao mesmo tempo que conserva a imunidade humoral normal.^[20] Igualmente, os sintomas clínicos de doenças auto-imunes mediadas por células regridem em muitas doentes durante a gravidez.^[20] A hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) é secretada principalmente pelo sincitiotrofoblasto placentário durante a gravidez e revelou ser imunorreguladora.^[21,22,23] A subunidade- β da hCG é degradada por enzimas proteolíticas específicas.^[24] Isto pode levar à libertação de vários oligopéptidos compostos por quatro a sete aminoácidos que, devido ao seu papel na regulação de processos fisiológicos, são considerados reguladores.^[25] Demonstrámos com sucesso que os oligopéptidos sintéticos podem inibir a resposta inflamatória aguda, a gravidade da doença e a mortalidade na síndrome de resposta inflamatória sistémica induzida

por lipopolissacarídeo de dose elevada.^[26] Considerando estes efeitos reguladores poderosos dos oligopéptidos sintéticos na inflamação, colocámos a hipótese de que a administração destes oligopéptidos reguladores após trauma-hemorragia grave poderia inibir a resposta inflamatória massiva associada a esta condição. Para tal, usámos LQGV, que faz parte da estrutura primária da ansa 2 da subunidade- β da hCG, e duas variantes de substituição da alanina, nomeadamente AQGV e LAGV.

[0018] Neste estudo demonstrámos que LQGV, AQGV e LAGV, administrados após a indução de choque hemorrágico em ratos, reduziram significativamente os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6, que se associam a níveis reduzidos de transcrição de mRNA para TNF- α e IL-6 no fígado. Isto indica que LQGV, AQGV, LAGV têm um potencial terapêutico com efeitos benéficos sobre a inflamação sistémica, reduzindo assim a integridade/função do órgão, que se associa a choque hemorrágico grave.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0019]

Fig. 1: Modelo de choque hemorrágico (HS) (* = tempo de administração do péptido A, B ou C nos grupos de administração de péptido).

Fig. 2: Tensão Arterial Média nas experiências placebo, choque e Péptido A, B e C.

Fig. 3: Hematócrito em experiências placebo, choque e Péptido A, B e C (da esquerda para a direita).

Fig. 4: Leucócitos durante experiências placebo,

trauma-hemorragia, pep. A, B e C.

Fig. 5: Macrófagos (MO) e granulócitos (GR) em experiências placebo, trauma-choque hemorrágico e Péptido A, B e C (da esquerda para a direita).

Fig. 6: Fluxo sanguíneo arterial em experiências placebo, choque e Péptido A, B e C (da esquerda para a direita).

FIG. 7. Modelo de choque hemorrágico. **A)** Representação esquemática do design experimental. **B)** O mmHg medido foi recalculado em percentagens para padronizar a experiência e compensar diferenças entre animais. **C)** Percentagem de leucócitos no sangue em vários pontos temporais da experiência.

FIG. 8. Níveis plasmáticos de $\text{TNF-}\alpha$ em grupos experimentais diferentes determinados 15 minutos antes e 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após o início de choque hemorrágico. $\square$ Placebo, $\circ$ HS, ∇ HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada valor representa um animal.

FIG. 9. Níveis plasmáticos de IL-6 em grupos experimentais diferentes determinados aos 120, 150 e 180 minutos após o início do choque hemorrágico. $\square$ Placebo, $\circ$ HS, ∇ HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada valor representa um animal.

FIG. 10. Níveis de transcrição para **A)** $\text{TNF-}\alpha$, **B)** IL-6 e **C)** ICAM-1 no fígado, 180 minutos após o início do choque hemorrágico. Os dados expressos são correlacionados com a expressão de GAPDH. $\square$ Placebo, $\circ$ HS, ∇ HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada valor representa um animal.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0020] A Patente U.S. 5,380,668 para Herron (10 de Jan.

1995), cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na totalidade, divulga, entre outros aspectos, vários compostos com actividade de ligação antigénica de hCG. Herron divulga ainda meios e métodos de produção de oligopéptidos.

[0021] Os compostos para uso de acordo com a fórmula geral podem ser preparados de um modo convencional para esses compostos. Para esse fim, derivados de péptidos ou aminoácidos adequadamente N-alfa protegidos (e protegidos a nível da cadeia lateral se estiverem presentes cadeias laterais reactivas) são activados e acoplados a derivados de péptidos ou aminoácidos com o carboxilo protegido, quer em solução, quer em suporte sólido. A protecção das funções amino-alfa geralmente ocorre através das funções uretano como o grupo *terc*-butiloxicarbonilo ("Boc") lábil ácido, grupo benziloxicarbonilo ("Z") e análogos substituídos ou o grupo 9-fluoremil-metiloxicarbonilo ("Fmoc") lábil básico. O grupo Z pode igualmente ser removido por hidrogenação catalítica. Outros grupos protectores adequados incluem o Nps, Bmv, Bpoc, Alloc, MSC, etc. Uma boa revisão dos grupos protectores de amino é apresentada em *The peptides. Analysis. Synthesis. Biology*, Vol. 3 E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Academic Press, New York, 1981). A protecção de grupos carboxilo pode ocorrer por formação de éster, por exemplo, ésteres lábeis básicos, como metilo ou etilo, ésteres lábeis ácidos como *terc*-butilo ou ésteres benzilo substituídos ou por hidrogenólise. A protecção das funções de cadeia lateral como as da lisina e ácido glutâmico ou aspártico pode ocorrer usando os grupos supramencionados. Protecção de tiol e, embora não seja sempre necessário, de grupos guanidino, álcool e imidazol pode ocorrer usando uma

variedade de reagentes, tais como os descritos em *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, *id.* ou em *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344 (1987). A activação do grupo carboxilo, dos aminoácidos adequadamente protegidos ou péptidos pode ocorrer através do método de azida, anidrido misto, éster activo ou carbodiimida, especialmente com a adição de compostos catalíticos e supressores da racemização, tais como 1-N--N-hidroxibenzotriazol, N-hidroxissuccinimida, 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3,-benzotriazina, N-hidroxi-5 norborneno-2,3-dicarboxiimida. Podem igualmente ser usados os anidridos de ácidos à base de fósforo. Ver, e.g., *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, *supra* e *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344 (1987).

[0022] Também é possível preparar os compostos pelo método de fase sólida de Merrifield. São conhecidos diferentes suportes sólidos e diferentes estratégias, ver, e.g., Barany and Merrifield in *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2, E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1980), Kneib-Cordonier and Mullen *Int. J. Peptide Protein Res.*, 30, 705-739 (1987) e Fields and Noble *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, 161-214 (1990). A síntese de compostos na qual uma ligação peptídica é substituída por um isoéster, pode, em geral, ser realizada usando os grupos protectores e procedimentos de activação previamente descritos. Procedimentos para sintetizar os isoésteres modificados são descritos na literatura, por exemplo, para o isoéster --CH₂-NH-- e para o isoéster --CO--CH₂ --.

[0023] A remoção dos grupos protectores e, em caso de

síntese de péptidos de fase sólida, a clivagem do suporte sólido, pode ocorrer de diferentes modos, dependendo da natureza destes grupos protectores e do tipo de ligante para o suporte sólido. Habitualmente, a desprotecção ocorre sob condições ácidas e na presença de agentes removedores. Ver, e.g., volumes 3, 5 e 9 da série em *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology, supra*.

[0024] Outra possibilidade é a aplicação de enzimas na síntese desses compostos; para revisões ver, e.g., H. D. Jakubke in *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, S. Udenfriend and J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1987).

[0025] Embora possivelmente não seja desejável do ponto de vista económico, os oligopéptidos de acordo com a invenção também podem ser produzidos segundo métodos de DNA recombinante. Estes métodos envolvem a preparação do oligopéptido pretendido através da expressão da sequência de polinucleótidos recombinantes que codifica um ou mais dos oligopéptidos em questão num microrganismo adequado como hospedeiro. Geralmente, o processo envolve introduzir num veículo de clonagem (e.g., um plasmídeo, DNA de fago ou outra sequência de DNA capaz de replicar numa célula hospedeira) uma sequência de DNA que codifica o oligopéptido ou oligopéptidos específicos, introduzir o veículo de clonagem numa célula hospedeira eucarótica ou procariótica adequada e cultivar a célula hospedeira assim transformada. Quando é usada uma célula hospedeira eucarótica, o composto pode incluir uma porção de glicoproteína.

[0026] Tal como aqui empregue, um "análogo funcional" ou "derivado" de um péptido inclui uma sequência de aminoácidos ou outra sequência de monómeros, que foi alterada para que as propriedades funcionais da sequência sejam essencialmente do mesmo tipo, embora não necessariamente na mesma quantidade. Um análogo ou derivado pode ser fornecido de muitos modos, por exemplo, através de "substituição conservadora de aminoácidos." Igualmente, podem ser concebidos compostos peptidomiméticos que se assemelham funcionalmente ou estruturalmente ao péptido original tomado como ponto de partida, mas que são, por exemplo, compostos por poliamidas ou aminoácidos de ocorrência não natural. Na "substituição conservadora de aminoácidos", um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo com propriedades similares (tamanho, hidrofobicidade), de forma a que seja pouco provável que o funcionamento geral seja seriamente afectado. Contudo, é frequentemente muito mais desejável melhorar uma função específica. Pode igualmente ser fornecido um derivado através da melhoria sistemática de pelo menos uma propriedade pretendida de uma sequência de aminoácidos. Isto pode, por exemplo, ser efectuado por Ala-scan e/ou método de mapeamento da rede de substituição. Com estes métodos, são gerados muitos péptidos diferentes, com base numa sequência de aminoácidos original, mas cada um contendo uma substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido. O resíduo de aminoácido pode ser substituído ou por alanina (Ala-scan) ou por qualquer outro resíduo de aminoácido (mapeamento da rede de substituição). Deste modo, são sintetizadas muitas variantes posicionais da sequência de aminoácidos original. Cada variante posicional é examinada para uma actividade específica. Os dados

gerados são usados para conceber derivados de péptidos com uma determinada sequência de aminoácidos.

[0027] Um derivado ou análogo pode igualmente ser, por exemplo, gerado por substituição de um resíduo de L-aminoácido com um resíduo de D-aminoácido. Esta substituição, que produz um péptido que não ocorre espontaneamente na natureza, pode melhorar uma propriedade de uma sequência de aminoácido. É, por exemplo, útil fornecer uma sequência peptídica de actividade conhecida de todos os D-aminoácidos em formato de retroversão, permitindo assim a manutenção da actividade e o aumento dos valores da semivida. Ao gerar muitas variantes posicionais de uma sequência de aminoácidos original e pesquisar uma actividade específica, podem ser concebidos derivados peptídicos melhorados que compreendam tais D-aminoácidos com outras características melhoradas.

[0028] Um especialista saberá como produzir compostos análogos de uma sequência de aminoácidos. Isto poderá, por exemplo, ser efectuado através do rastreio de uma biblioteca de péptidos. Um tal análogo tem essencialmente as mesmas propriedades funcionais da sequência em tipo, mas não necessariamente em quantidade. Igualmente, péptidos ou análogos pode ser tornados circulares, por exemplo, fornecendo-lhes cisteínas (terminais), dimerizadas ou multimerizadas, por exemplo, por ligação a lisina ou cisteína ou outros compostos com cadeias laterais que permitem a ligação ou multimerização, postos em configuração em tandem ou de repetição, conjugados ou ligados de outro modo a veículos conhecidos na arte, nem

que seja por uma ligação lábil que permite a dissociação.

[0029] Como aqui usado, um oligopéptido inclui igualmente, por exemplo, um sal, base ou éster aceitável do oligopéptido ou um oligopéptido marcado. Como aqui empregue, "sal aceitável" refere-se a sais que conservam a actividade pretendida do oligopéptido ou composto equivalente, mas, de preferência, não afectam prejudicialmente a actividade do oligopéptido ou outro componente de um sistema que usa o oligopéptido. Exemplos desses sais são sais de adição ácidos formados a partir de ácidos inorgânicos, por exemplo, ácido clorídrico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico ou similares. Os sais podem igualmente ser formados com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzóico, ácido tânico, ácido pamóico, ácido algínico, ácido poliglutamico ou similares. Podem ser formados sais a partir de catiões de metal polivalentes como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel ou similares, ou a partir de catiões orgânicos formados a partir de N,N'-dibenziletilenodiamina ou etilenodiamina ou combinações destas (e.g., um sal de tanato de zinco).

[0030] O oligopéptido ou a sua modificação ou derivado, pode ser administrado como a entidade, como tal, ou como um sal de adição ácido ou básico farmacologicamente aceitável, formado por reacção com um ácido inorgânico (como o ácido clorídrico, ácido hidrobromico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido

sulfúrico e ácido fosfórico); ou com um ácido orgânico (como o ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico e ácido fumárico); ou por reacção com uma base inorgânica (como hidróxido de sódio, hidróxido de aminónio, hidróxido de potássio); ou com uma base orgânica (como aminas mono-, di-, triarilquilo e arilo e etanolaminas substituídas). Um péptido seleccionado e qualquer uma das entidades derivadas podem igualmente ser conjugados com açúcares, lípidos, outros polipéptidos, ácidos nucleicos e PNA, e funcionar *in situ* como conjugados ou serem libertados localmente depois de atingirem um tecido ou órgão alvo.

[0031] Uma composição farmacêutica para uso na presente invenção pode ser administrada ao sujeito por via parentérica ou oral. Uma tal composição farmacêutica pode consistir essencialmente em oligopéptido e PBS. É preferido que o oligopéptido seja de origem sintética. O tratamento adequado implica, por exemplo, a administração do oligopéptido (ou sal ou éster) na composição farmacêutica ao doente por via intravenosa numa quantidade de cerca de 0,0001 a cerca de 35 mg/kg de massa corporal do sujeito. Pode ser útil que a composição farmacêutica consista essencialmente em um até três oligopéptidos diferentes.

[0032] A invenção é ainda descrita por intermédio dos seguintes exemplos ilustrativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Materiais e métodos

[0033] Ratos Wistar macho adultos, livres de agentes patogénicos, (Harlan CPB, Zeist, Países Baixos), pesando 350-400 g, foram usados após um período mínimo de aclimação de sete dias. Os animais foram alojados em condições de barreira e mantidos a 25°C com um ciclo de luz/escuridão de doze horas. Foi dado aos ratos livre acesso à água e ração (-). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório da NIH (publicação N.º 86-23, revista em 1985) seguindo um protocolo aprovado pela Comissão de Ética de Pesquisa com Animais da Universidade Erasmus (protocolo EUR 365).

[0034] Os ratos foram mantidos em jejum de um dia para o outro, com livre acesso à água antes da experiência. Subsequentemente à entubação endotraqueal, os ratos foram sujeitos a ventilação mecânica com uma mistura de isofluorano e (-) N₂O/O₂ a 60 respirações/minuto. A temperatura corporal foi mantida continuamente a 37,5 °C colocando os animais numa calha termicamente controlada (UNO, Países Baixos). Tubos de polietileno (PE-50, Becton Dickinson; St. Michielsgestel, Países Baixos) foram irrigados com heparina e colocados através da artéria carótida direita na aorta e na veia jugular interna direita. Os animais não receberam heparina antes ou durante a experiência.

[0035] A tensão arterial média (TAM) foi medida usando

transdutores (Becton Dickinson) que foram ligados em linha a um gravador electrónico (Hewlett Packard, 78354-A Alemanha) para as tensões médias calculadas electronicamente e medição contínua da tensão arterial do animal. Sob condições semi-estéreis, foi realizada uma laparotomia mediana e foram colocadas sondas ultra-sónicas de fluxo perivascular (Transonic Systems Inc, Maastricht, Países Baixos) na artéria hepática e na veia porta. Foi colocado um cateter supra-púbico para monitorizar a produção de urina durante e após a reanimação.

[0036] Após um período de aclimação de 20 minutos, os ratos foram distribuídos aleatoriamente pelos seguintes cinco grupos:

[0037] O grupo do choque hemorrágico foi sangrado no prazo de dez minutos para atingir uma tensão arterial média (TAM) de 40 mmHg e mantido neste nível durante 60 minutos retirando ou voltando a infundir o sangue retirado, conforme necessário. Depois disso, os animais foram reanimados com aproximadamente quatro vezes o volume do sangue tirado ao longo de 30 minutos com uma solução de NaCl a 0,9%.

[0038] O grupo de choque hemorrágico + péptido A (LAGV; código de amino ácido de uma letra) foi submetido ao mesmo procedimento do que o grupo de choque hemorrágico, mas os sujeitos receberam uma injeção de bólus único de 5 mg/kg de péptido A por via intravenosa 30 minutos após a indução de choque.

[0039] O grupo de choque hemorrágico + péptido B (AQGV)

foi submetido ao mesmo procedimento do que o grupo de choque hemorrágico, mas os sujeitos receberam uma injeção de bólus único de 5 mg/kg de péptido B por via intravenosa 30 minutos após a indução de choque.

[0040] O grupo de choque hemorrágico + péptido C (LQGV) foi submetido ao mesmo procedimento do que o grupo de choque hemorrágico, mas os sujeitos receberam uma injeção de bólus único de 5 mg/kg de péptido C por via intravenosa 30 minutos após a indução de choque.

[0041] O grupo placebo foi submetido ao mesmo procedimento do que o grupo de choque hemorrágico sem sofrer a hemorragia ou a administração de qualquer tipo de péptidos.

[0042] O fluxo de sangue arterial hepático (QHA) e o fluxo de sangue da veia portal hepática (QVP) foram determinados com sondas ultra-sónicas de fluxo perivascular de tempo de trânsito, ligadas a um medidor ultra-sónico (T201; Transonic Systems, Inc., Maastricht, NL). Os valores da hemodinâmica sistémica e hepática foram determinados continuamente. Foram colhidas amostras de sangue arterial em pontos temporais regulares. Os animais foram sacrificados por extracção de sangue arterial via artéria carótida.

Procedimento de colheita de sangue, tecido e células

[0043] *Colheita e armazenamento de plasma:* Sangue arterial total foi obtido aos -15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a indução de choque via artéria carótida direita, sendo colhido em duplicado.

0,2 ml foram colocados em tubos (Eppendorf EDTA KE/1.3) para serem testados no contador de Coulter (-). 0,5 ml foram colocados em tubos Minicollect (Bio-one, Greiner), centrifugados durante cinco minutos, imediatamente congelados e guardados a -80°C até ao ensaio. Todos os ensaios foram corrigidos em função do hematócrito.

[0044] *Medição de citocinas (ainda em curso):* Os níveis séricos de IL-6 e IL-10 foram determinados por ELISA (R&D Systems Europe Ltd) de acordo com as instruções do fabricante.

[0045] *Histologia (ainda em curso):* As alterações na morfologia do pulmão, fígado, intestino delgado e sigmóide foram examinadas em animais tratados com placebo, em animais após trauma-hemorragia e em animais após trauma-hemorragia tratados com péptido A, B ou C. Todos os tecidos foram colhidos em duplicado. Uma parte foi colhida e fixada em formalina (Sigma) e posteriormente embebida em parafina. A outra parte foi colocada em tubos (Fracos NUNC Cryotube™), rapidamente congelada em nitrogénio líquido e guardada a -80°C até ao ensaio.

Resultados

[0046] *Tensão Arterial Média:* A TAM caiu de forma significativa em todos os grupos de choque durante a fase de choque comparativamente ao grupo de controlo.

[0047] *Hematócrito:* O hematócrito após trauma-hemorragia foi similar nos diferentes grupos tratados e não tratados

com péptido A, B e C. Durante a fase de choque registou-se uma diferença no hematócrito no grupo de controlo em comparação com os outros grupos. A partir da fase de reanimação (90 minutos) não houve diferença significativa no hematócrito entre os grupos de controlo, trauma-hemorragia e péptido.

[0048] *Recrutamento de Leucócitos:* No decurso de trauma-hemorragia, os leucócitos caíram de 100% no T0 em todos os grupos para um mínimo de $40,0 \pm 11,9\%$, $42,0 \pm 8,7\%$, $47,3 \pm 12,4\%$, $38,2 \pm 7,4\%$, respectivamente nos grupos sem tratamento, tratados com péptido A, tratados com péptido B e tratados com péptido C, devido à acumulação de leucócitos na microcirculação esplâncnica. Verificou-se uma diferença significativa na concentração de leucócitos entre todos os grupos de trauma-hemorragia tratados e não tratados e o grupo de controlo durante a fase de choque. Não foi observada uma diferença significativa entre os animais tratados com péptido A, B ou C e os animais não tratados.

[0049] *Concentrações sanguíneas de macrófagos e granulócitos:* Aos 180 min. após o início do trauma-hemorragia, as concentrações de macrófagos ($M\phi$) e granulócitos em circulação eram significativamente inferiores nos animais tratados com péptido B e C comparativamente ao grupo experimental correspondente. Os níveis sanguíneos de $M\phi$ e granulócitos em circulação foram de $5.556 \pm 1.698 \cdot 10^9/l$ em animais tratados com placebo, ao passo que os níveis sanguíneos de foram de $6.329 \pm 1.965 \cdot 10^9/l$ após trauma-hemorragia, e diminuíram 29,9% após administração do péptido B ($4.432 \pm 0,736 \cdot 10^9/l$) e

39,2% após administração do péptido C ($3.846 \pm 0,636$ $10^9/l$) comparativamente às concentrações após trauma-hemorragia.

[0050] *Fluxo sanguíneo arterial hepático:* Houve uma redução do fluxo de sangue arterial hepático no grupo de choque ($18,3 \pm 14,3\%$) e nos grupos do péptido A ($21,3 \pm 9,1\%$), B ($18,1 \pm 9,0\%$) e C ($21,2 \pm 8,6\%$) durante o período de choque comparativamente ao grupo de controlo ($102,6 \pm 23,5\%$). Um aumento do fluxo sanguíneo foi observado durante a reperfusão na artéria hepática do grupo de choque ($128,9 \pm 75,4\%$), comparativamente aos animais de controlo ($83,7 \pm 24,2\%$) e aos animais tratados com péptido B ($78,4 \pm 28,3\%$).

[0051] Trauma-hemorragia resulta em stress hipóxico devido à redução absoluta no volume de sangue em circulação. Em contraste, a sépsis é um estado inflamatório mediado principalmente por produtos bacterianos. É interessante que estas agressões divergentes revelem alterações patofisiológicas similares em termos da circulação esplâncnica.

[0052] O choque hemorrágico aumenta significativamente a acumulação de leucócitos na microcirculação esplâncnica devido à regulação positiva da P-selectina. A expressão da molécula de adesão intercelular dentro da vasculatura muscular intestinal após choque hemorrágico promove o recrutamento local de leucócitos e esta resposta inflamatória é acompanhada por distúrbio subsequente da função intestinal.

[0053] A adesão e extravasamento de neutrófilos não apenas contribui para a resposta inflamatória no tecido esplâncnico, como também induz falha e disfunção da microcirculação intestinal após stress grave. Isto é mediado pela expressão induzida de moléculas de adesão, tais como selectinas e moléculas de adesão celular endotelial, na superfície de neutrófilos e células endoteliais.

[0054] Nas nossas experiências de choque, a concentração de leucócitos diminui significativamente durante o choque hemorrágico, quando comparada com os animais de controlo. Contudo, uma dose única de péptido B ou C administrada durante a reanimação, reduziu as concentrações de macrófagos e granulócitos em circulação 120 minutos após o início do choque hemorrágico, comparativamente aos animais não tratados.

[0055] Uma vez que algumas hormonas sexuais femininas protegem efectivamente os órgãos contra a falha circulatória após várias condições circulatórias adversas, numerosos estudos têm sido realizados para clarificar o mecanismo molecular, por exemplo, da acção do estradiol em relação à circulação tecidular. Neste estudo, foi administrada uma dose única de péptido após trauma-hemorragia e foram medidos vários parâmetros 3 horas após a indução de choque. O tratamento com péptidos melhorou ou restaurou os parâmetros funcionais imunitários e as funções cardiovasculares. Assim, os nossos resultados demonstram que a administração de oligopéptidos curtos (NMPFs) é benéfica no tratamento de vítimas de trauma gravemente afectadas que sofram de choque hemorrágico.

Exemplo 2

[0056] ANTECEDENTES: O choque hemorrágico seguido de reanimação induz uma resposta pró-inflamatória massiva que pode culminar em síndrome de resposta inflamatória grave, falência de múltiplos órgãos e finalmente morte.

Os tratamentos destinados a inibir os efeitos das citocinas pró-inflamatórias só são eficazes quando iniciados antes do aparecimento de choque hemorrágico, o que limita grandemente a sua aplicação clínica.

[0057] OBJECTIVO: Investigámos se a administração de oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) 30 minutos após a indução de choque hemorrágico reduziria a resposta inflamatória.

[0058] MÉTODOS: Os ratos foram sangrados até atingirem 50% da tensão arterial média de base e uma hora mais tarde reanimados através de transfusão de sangue autóloga. Trinta minutos após o aparecimento de choque hemorrágico, os grupos experimentais receberam ou um dos oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) ou uma solução de NaCl a 0,9%. Os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 foram determinados em pontos temporais fixos antes e depois do aparecimento de choque hemorrágico. Os níveis de mRNA no fígado, pulmões, íleo e sigmóide para TNF- α , IL-6 e ICAM-1 foram determinados 180 minutos após o início da hemorragia.

[0059] RESULTADOS: O tratamento com qualquer um dos três oligopéptidos (LQGV, AQGV, LAGV) reduziu eficazmente os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6, assim como os níveis

de transcrição de mRNA para TNF- α e IL-6 no fígado.

[0060] CONCLUSÃO: Considerando estes efeitos poderosos dos oligopéptidos durante o choque hemorrágico grave, estes podem ter um potencial terapêutico com efeitos benéficos na hiper-inflamação, reduzindo assim posteriores danos potencialmente letais aos órgãos e tecidos que se associam ao choque hemorrágico grave.

[0061] INTRODUÇÃO: No choque hemorrágico há uma perda de sangue massiva, que não é possível compensar pelo corpo sem tratamento. O tratamento primário do choque hemorrágico é controlar a hemorragia e restaurar o volume intravascular para melhorar a perfusão dos tecidos. Este tratamento induz uma resposta inflamatória, que pode culminar numa resposta inflamatória grave e finalmente em síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO).^[1,2,3] Adicionalmente, cerca de 40 % dos doentes desenvolvem sépsis em resultado do trauma-hemorragia.^[3] Sépsis e SDMO são as principais causas de morte em doentes gravemente afectados nas unidades de cuidados intensivos em todo o mundo, com taxas de mortalidade de cerca de 50%.^[4,5]

[0062] A resposta inflamatória grave devida a trauma-hemorragia é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, tais como moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), em células endoteliais sinusoidais e hepatócitos. Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias são encontrados sistemicamente e localmente no fígado, pulmões e intestinos.^[6,7,8,9] As citocinas pró-inflamatórias produzidas são, em particular, o factor de

necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina (IL)-1 β e a IL-6.^[10,11,12] Estas citocinas afectam a integridade/função do órgão directamente, mas também indirectamente através de mediadores secundários, tais como óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, factor de activação de plaquetas, prostaglandinas e complemento.^[13,14]

O TNF- α causa igualmente a libertação de factor tecidular pelas células endoteliais levando a deposição de fibrina e coagulação intravascular disseminada.^[15, 16] As células hepáticas, principalmente células Kupffer, mas igualmente hepatócitos e células endoteliais sinusoidais, são consideradas como os produtores principais destas citocinas pró-inflamatórias no decurso de choque hemorrágico.^[17]

[0063] Na última década, os investigadores têm-se focado na modulação das respostas inflamatórias sistémicas com agentes terapêuticos destinados a neutralizar a actividade das citocinas, especialmente do TNF- α .^[18] Outros investigadores usaram agentes terapêuticos dirigidos à inibição da produção de TNF- α .^[19] Contudo, a maior parte destes agentes terapêuticos deve ser administrada antes do início do choque hemorrágico para obter um efeito terapêutico.^[19] Claramente, isto é quase impossível numa situação de trauma-hemorragia clínica. Assim, as terapias iniciadas após o início de trauma-hemorragia grave e destinadas a reduzir a produção de citocina pró-inflamatória são mais relevantes para prevenir os acontecimentos que levam a SDMO.

[0064] Durante a gravidez, o sistema imunitário materno tolera o feto reduzindo a resposta imunitária mediada por

células, ao mesmo tempo que conserva a imunidade humoral normal.^[20] Igualmente, os sintomas clínicos de doenças auto-imunes mediadas por células regridem em muitas doentes durante a gravidez.^[20] A hormona gonadotrofina coriônica humana (hCG) é secretada principalmente pelo sincitiotrofoblasto placentário durante a gravidez e revelou ser imunorreguladora.^[21, 22, 23] A subunidade- β da hCG é degradada por enzimas proteolíticas específicas.^[24] Isto pode levar à libertação de vários oligopéptidos compostos por quatro a sete aminoácidos que, devido ao seu papel na regulação de processos fisiológicos, são considerados reguladores.^[25] Demonstrámos com sucesso que os oligopéptidos sintéticos podem inibir a resposta inflamatória aguda, a gravidade da doença e a mortalidade na síndrome de resposta inflamatória sistémica induzida por lipopolissacarídeo de dose elevada.^[26] Considerando estes efeitos reguladores poderosos dos oligopéptidos sintéticos na inflamação, colocámos a hipótese de que a administração destes oligopéptidos reguladores após trauma-hemorragia grave poderia inibir a resposta inflamatória massiva, associada a esta condição. Para tal, usámos LQGV, que faz parte da estrutura primária da ansa 2 da subunidade- β da hCG, e duas variantes de substituição da alanina, nomeadamente AQGV e LAGV.

[0065] Neste estudo demonstrámos que LQGV, AQGV e LAGV, administrados após a indução de choque hemorrágico em ratos, reduziram significativamente os níveis plasmáticos do TNF- α e da IL-6, que se associam a níveis reduzidos de transcrição de mRNA para TNF- α e IL-6 no fígado. Isto indica que LQGV, AQGV, LAGV têm um potencial terapêutico com efeitos benéficos sobre a inflamação sistémica,

reduzindo assim a integridade/função do órgão que se associa ao choque hemorrágico grave.

Materiais e métodos

Animais

[0066] Foram usados ratos Wistar macho adultos livres de agentes patogénicos (*Harlan CPB, Zeist, Países Baixos*), pesando 350-400 g. Os animais foram alojados em condições de barreira e mantidos a 25°C com um ciclo de luz/escuridão de doze horas, com alimentos e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comité de Experimentação Animal sob a Lei holandesa sobre as experiências com animais e cumpriu as regras estabelecidas por esta lei nacional que permitiu a implementação das "Orientações de protecção de animais utilizados para fins experimentais" pelo Concelho da Europa (1986), Directiva 86/609/CEE.

[0067] *Oligopéptidos sintéticos*: Os oligopéptidos (LQGV, AQGV e LAGV) foram sintetizados pelo Ansynth Service B.V. (*Roosendaal, Países Baixos*) e dissolvidos em NaCl a 0,9% numa concentração de 10 mg/ml.

[0068] *Procedimentos cirúrgicos*: Os ratos ficaram em jejum de um dia para outro antes da experiência, mas puderam consumir água *ad libitum*. Os ratos foram anestesiados usando uma mistura de N₂O/O₂ e isofluorano (*Pharmachemie B.V., Haarlem, Países Baixos*). A temperatura corporal foi mantida continuamente a 37,5 °C colocando os ratos numa calha termicamente controlada (*UNO, Rotterdam, Países*

Baixos). Foi realizada entubação endotraqueal e os ratos foram sujeitos a ventilação mecânica a 60 respirações por minuto com uma mistura de N₂O/O₂ e isofluorano a 2%. Tubos de polietileno (PE-50, Becton Dickinson; St. Michielsgestel, Países Baixos) foram irrigados com heparina e colocados através da artéria carótida direita na aorta e na veia jugular interna direita. Os ratos não receberam heparina antes ou durante a experiência.

[0069] *Procedimentos experimentais:* Após um período de aclimação de 15 minutos, os ratos foram distribuídos aleatoriamente por cinco grupos diferentes: 1) placebo, 2) choque hemorrágico (HS), 3) choque hemorrágico com tratamento com LQGV (HS/LQGV), 4) choque hemorrágico com tratamento com AQGV (HS/AQGV) e 5) choque hemorrágico com tratamento com LAGV (HS/LAGV). O choque hemorrágico foi induzido por extracção de sangue, reduzindo o volume de sangue em circulação até atingir uma tensão arterial média (TAM) de 50% do mmHg normal. Este nível de hipotensão foi mantido durante 60 minutos. Após 30 minutos, os ratos receberam ou uma injeção de bólus único de 10 mg/kg de LQGV, AQGV, LAGV ou solução de NaCl a 0,9%. Os péptidos e a dosagem foram baseados em estudos anteriores, nos quais realizámos experiências de escalonamento de dose (manuscrito em preparação). Sessenta minutos após a indução de choque hemorrágico, os ratos foram reanimados através de transfusão de sangue autóloga ao longo de um período de 30 minutos e monitorizados por mais 120 minutos, após os quais foram sacrificados (Fig. 7A). Os animais do grupo placebo foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico que os animais de choque hemorrágico, mas sem a realização da hemorragia e a administração de péptidos.

[0070] *Colheita e armazenamento de plasma:* O sangue arterial foi obtido 15 minutos antes e 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após o início da hemorragia (Fig. 7A). Após a extracção de sangue, foram determinados os valores leucocitários usando um contador de Coulter (*Beckman Coulter, Mijdrecht, Países Baixos*) e corrigidos em função do hematócrito. Cerca de 0,3 ml de sangue foram colocados em mini-tubos de colheita (*Greiner, Bio-one, Alphen a/d Rijn, Países Baixos*), o plasma foi obtido por centrifugação (1500 r.p.m.; 5 minutos), imediatamente congelado e guardado a -80°C até ao ensaio.

[0071] *Medições da Tensão arterial média:* Durante as experiências, a tensão arterial média (TAM) foi continuamente determinada usando transdutores (*Becton Dickinson*) que foram ligados em linha a um gravador electrónico (*Hewlett Packard, 78354-A, Alemanha*).

[0072] *Colheita e armazenamento de tecido:* Fígado, pulmões, íleo e sigmóide foram removidos cirurgicamente no final da experiência, sujeitos a congelação rápida e guardados at -80°C até ao ensaio.

[0073] *Medição de citocinas:* Os níveis plasmáticos do TNF- α e da IL-6 foram determinados por ELISA (*R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK*), de acordo com as instruções do fabricante.

[0074] *Avaliação dos níveis de mRNA por (RQ)-PCR quantitativo em tempo real:* O RNA foi isolado usando um kit *QIAGEN (QIAGEN, Hidden, Alemanha)*, de acordo com as instruções do fabricante. As transcrições de TNF- α , IL-6 e ICAM-1 foram determinadas por RQ-PCR usando um

equipamento de PCR da Applied Biosystems 7700 (Foster City, CA, EUA), tal como descrito anteriormente.^[27] A expressão de TNF- α , IL-6 e ICAM-1 foi quantificada por normalização contra GAPDH. As combinações de sonda de *primer* usadas estão listadas na Tabela 1.

[0075] *Análise estatística:* A análise estatística foi realizada usando o software SPSS, versão 11 (SPSS Inc., Chicago, Ill). As diferenças intergrupais foram analisadas com o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Se o teste estatístico de Kruskal-Wallis resultasse num $p < 0,05$, era realizado um teste de múltiplas comparações de Dunn e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

[0076] *Indução de choque hemorrágico:* Reduzir a TAM para 50% do valor normal induziu o choque hemorrágico, que foi mantido com sucesso durante 60 minutos nos quatro grupos experimentais (Fig. 7B). Não foi observada qualquer alteração na TAM em ratos tratados com placebo (Fig. 7B). Foi observada uma redução na percentagem de leucócitos sanguíneos em todos os quatro grupos experimentais após a extracção de sangue (Fig. 7C). Sessenta minutos após o choque hemorrágico, os ratos foram reanimados com o seu próprio sangue para induzir a reperfusão do órgão, que foi associada a uma normalização do nível de leucócitos (Fig. 7C).

[0077] *O tratamento com oligopéptidos reduz os níveis plasmáticos de citocina pró-inflamatória:* A capacidade terapêutica de três oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV,

LAGV) relacionada com a estrutura primária da ansa 2 da subunidade- β da hCG foi avaliada num modelo de choque hemorrágico em ratos. Antes da indução da hemorragia, os níveis plasmáticos do TNF- α foram comparáveis em todos os cinco grupos (~15-24 pg/ml) (Fig. 8). No grupo HS, os níveis de TNF- α começaram a aumentar trinta minutos após a indução de choque hemorrágico e aumentaram significativamente após sessenta minutos, quando comparados com o grupo placebo (264 pg/ml vs 24 pg/ml, respectivamente; $p < 0,01$). Os níveis de TNF- α atingiram um máximo de 374 pg/ml após 90 minutos no grupo HS, após o que os níveis declinaram novamente, mas sempre mantendo-se superiores aos do grupo placebo (Fig. 8). Em contraste, nenhum dos grupos HS tratados com oligopéptidos (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) revelou um aumento nos níveis plasmáticos do TNF- α durante a experiência (Fig. 8). Sabe-se que os níveis de IL-6 aumentam num ponto temporal mais tardio do que os do TNF- α após hemorrágico choque grave.^[11, 12] Assim, determinámos os níveis de IL-6 em amostras de sangue colhido 120, 150 e 180 minutos após o início do choque hemorrágico. No grupo HS, os níveis plasmáticos de IL-6 aumentaram significativamente, quando comparados com o grupo placebo aos 120 minutos (1704 pg/ml vs 338 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$), aos 150 minutos (2406 pg/ml vs 316 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$) e aos 180 minutos (2932 pg/ml vs 369 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$) (Fig. 9). Embora os níveis de IL-6 tenham apresentado a tendência de aumentar um pouco nos ratos tratados com HS/oligopéptido, quando comparados com ratos tratados com placebo, isto não chegou a ser estatisticamente significativo. O tratamento com oligopéptidos após choque hemorrágico (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) resultou numa redução significativa dos níveis

plasmáticas de IL-6 quando comparados com os do grupo de choque hemorrágico não tratado (HS) (Fig. 9). Estes dados demonstraram que o tratamento com uma única dose de LAGV, AQGV ou LAGV após a indução de choque hemorrágico, produz uma redução significativa dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6.

[0078] *O tratamento com oligopéptidos reduz o TNF- α e a IL-6, mas não os níveis de mRNA de ICAM-1 no fígado:* Já que o tratamento com oligopéptidos reduziu claramente os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6, analisámos os níveis de mRNA nos tecidos do fígado, pulmões, íleo e sigmóide aos 180 minutos após o início do choque hemorrágico. No fígado, as transcrições de TNF- α aumentaram significativamente no grupo HS quando comparado com o grupo placebo. O tratamento com oligopéptidos foi associado a redução das transcrições de TNF- α no fígado, quando comparado com o que ocorre no caso de ratos HS não tratados; apenas o grupo HS/LQGV revelou uma redução significativa quando comparado com HS ($p < 0,01$; Fig. 10A).

[0079] No grupo HS, as transcrições de IL-6 no fígado aumentaram ~83 vezes, por comparação com o grupo placebo ($p < 0,001$; Fig. 10B). Nenhum dos grupos tratados com oligopéptido revelou um aumento no mRNA da IL-6, quando comparado com o grupo tratado com placebo. O tratamento com LQGV e AQGV resultou numa redução significativa das transcrições de mRNA da IL-6, quando comparado com o grupo HS ($p < 0,05$; Fig. 10B).

[0080] Os níveis de transcrição de ICAM-1 no fígado aumentaram significativamente no grupo HS, quando comparado com o grupo placebo (Fig. 10C). O tratamento

com oligopéptido durante o choque hemorrágico (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) não afectou os níveis de transcrição de ICAM-1 no fígado (Fig. 10C). Nos tecidos dos pulmões, íleo e sigmóide, não foram detectadas diferenças significativas entre os vários grupos para TNF- α , IL-6 e ICAM-1 (dados não representados). Estes dados indicam que o tratamento com oligopéptidos após choque hemorrágico reduz os níveis de transcrição de citocina pró-inflamatória no fígado, mas não reduz os níveis de transcrição de ICAM-1.

DISCUSSÃO

[0081] Neste estudo usámos um modelo murino de choque hemorrágico e demonstrámos que a administração de oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) 30 minutos após a indução de choque, reduz eficazmente os níveis de citocina pró-inflamatória associada a esta condição. Os nossos dados demonstraram que tal é uma consequência provável da expressão reduzida dos níveis de transcrição de mRNA da citocina pró-inflamatória no fígado.

[0082] O choque hemorrágico associa-se a uma aderência precoce dos leucócitos ao endotélio vascular em resultado de um volume de sangue reduzido.^[28] No nosso modelo, foi detectada uma redução na percentagem de leucócitos nos quatro grupos experimentais após a extracção de sangue. Isto indica que todos os grupos experimentais experimentaram choque induzido por hemorragia. A reanimação resultou num aumento das percentagens de leucócitos nos grupos experimentais.

[0083] O choque hemorrágico seguido de reanimação induz uma resposta inflamatória grave, que se caracteriza por uma produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias iniciais, tais como TNF- α e IL1 β , e posteriormente de IL-6.^[10,11,12] O TNF- α é um mediador chave do sistema imunitário inato que é crucial para a geração de uma resposta imunitária local protectora contra agentes infecciosos ou não infecciosos.^[9] Contudo, a produção descontrolada massiva de TNF- α é letal, já que se espalha através da corrente sanguínea para outros órgãos, induzindo assim danos nos tecidos e promovendo a produção de mediadores pró-inflamatórios secundários, como a IL-6.^[10,11]

[0084] Apesar das melhorias nas estratégias de tratamento, os doentes com trauma-hemorragia continuam a poder desenvolver uma resposta inflamatória grave que conduz a SDMO e, finalmente, a morte. Estratégias experimentais de tratamento destinadas a neutralizar citocinas bioactivas, como anticorpos monoclonais contra o TNF- α , têm sido aplicadas com sucesso em vários distúrbios inflamatórios, incluindo a doença de Crohn e a artrite reumatóide.^[29, 30]

Contudo, estudos clínicos que empregaram anticorpos monoclonais contra o TNF- α não revelaram qualquer efeito clínico em doentes de traumatologia.^[31] Tem sido sugerido que os anticorpos de neutralização do TNF- α causam a acumulação de uma grande quantidade de TNF- α /anti-TNF- α , que actua como um reservatório de libertação lenta que pode conduzir ao aumento de TNF- α constantemente activo.^[32] Assim, aplicar terapias que reduzem a produção de TNF- α e IL-6 pode ser mais benéfico na limitação de danos nos tecidos e das taxas de mortalidade em doentes

com trauma-hemorragia, do que neutralizar citocinas já produzidas.

[0085] No choque hemorrágico, é secretado TNF- α no espaço de minutos após a estimulação celular, enquanto a produção pára ao fim de três horas, e os níveis plasmáticos de TNF- α se tornam quase indetectáveis.^[9] Demonstrámos que os oligopéptidos reguladores (LQGV, AQGV, LAGV), administrados 30 minutos após a indução de choque hemorrágico, reduziram significativamente os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6. Não é possível concluir a partir dos nossos dados se o efeito na produção de IL-6 é directo ou indirecto devido aos níveis plasmáticos reduzidos de TNF- α . Não obstante, a nível clínico é importante efectuar uma redução da IL-6, porque os níveis plasmáticos elevados da IL-6 se correlacionam com um mau prognóstico e diminuição da sobrevivência em doentes com traumatismo grave e infecção.^[33, 34] As células dentro do fígado são consideradas como os produtores principais de citocinas pró-inflamatórias no decurso do choque hemorrágico.^[17] Os níveis de transcrição de TNF- α e IL-6 aumentaram significativamente nos fígados do grupo HS. O tratamento com LQGV, AQGV ou LAGV foi associado a uma redução nas transcrições no fígado do TNF- α e da IL-6, o que pode ser indicativo da redução da activação transcricional. Outra característica importante das células endoteliais e hepatócitos durante o choque hemorrágico é o aumento da expressão da molécula de adesão ICAM-1.^[7, 8] O nosso estudo confirma o aumento da expressão de ICAM-1 no fígado após choque hemorrágico. Contudo, o tratamento com LQGV, AQGV ou LAGV não resultou na redução da expressão de ICAM-1. Isto pode

dever-se à incapacidade dos oligopéptidos em interferirem com a indução da transcrição de ICAM-1. Nos pulmões, íleo e sigmóide, não detectámos qualquer efeito do choque hemorrágico na indução de transcrições de TNF- α , IL-6 e ICAM-1. Isto confirma que o fígado é o primeiro órgão no qual a resposta inflamatória é iniciada após choque hemorrágico e reanimação volúmica.^[15, 31, 32]

[0086] Na literatura, está bem descrito que a hCG pode regular o sistema imunitário, devido ao seu papel putativo na prevenção da rejeição do aloenxerto fetal durante a gravidez.^[35,36] O hCG exerce a sua função ligando-se a receptores específicos ligados à membrana, que activam os segundos mensageiros.^[37] Espera-se que os oligopéptidos cruzem as membranas celulares sem necessidade dos receptores ligados à membrana^[38] e exerçam os seus efeitos intracelularmente. Este estudo e estudos em curso no nosso laboratório demonstram que estes oligopéptidos têm um efeito regulador distinto na expressão dos genes envolvidos nas vias inflamatórias e na imunidade. Não obstante, é necessária investigação acerca do mecanismo de acção dos péptidos relacionados com hCG na regulação da expressão genética.

[0087] Recentemente, foi publicado um estudo no qual o dipéptido AG inibiu a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias no fígado após choque hemorrágico.^[39] Contudo, foi necessária uma dose peptídica muito elevada de AG (150 mg/kg), em que observámos os efeitos nítidos de usar 10 mg/kg no nosso estudo. Não obstante, este aspecto e o nosso estudo indicam que o uso de oligopéptidos específicos pode ser considerado como

agentes terapêuticos para o tratamento da resposta inflamatória após traumatismo grave.

[0088] Em suma, uma única administração de um oligopéptido sintético (LQGV, AQGV, LAGV) após a indução de trauma-hemorragia grave reduz a resposta pró-inflamatória subsequente. Estes dados sugerem que estes oligopéptidos têm potencial terapêutico, minimizando posteriores danos potencialmente letais aos órgãos e tecidos que se associam ao choque hemorrágico grave.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[0089]

1. Vincent JL., Carlet, J., Opal, S.M., eds., The sepsis text, 2002.
2. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420:885-891.
3. Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. Crit Care Med. 2004; 32(11):2234-40.
4. DS, Lefering R, Wade CE..Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. J Trauma, 2006, 60(6):83-11.
5. Muylle L. The role of cytokines in blood transfusion reactions. Blood Rev 1995; 9:77-83.

6. Matsutani T, Kang SC, Miyashita M, Sasajima K, Choudhry MA, Bland KI, et al. Liver cytokine production and ICAM-1 expression following bone fracture, tissue trauma, and hemorrhage in middle-aged mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:268-74.
7. Rothoerl RD, Schebesch KM, Kubitza M, Woertgen C, Brawanski A, Pina AL. ICAM-1 and VCAM-1 expression following aneurysmal subarachnoid hemorrhage and their possible role in the pathophysiology of subsequent ischemic deficits. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22:143-9.
8. Sun LL, Ruff P, Austin B, Deb S, Martin B, Burris D, et al. Early up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression in rats with hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 1999; 11:416-22.
9. Ferguson KL, Taheri P, Rodriguez J, Tonapi V, Cardellino A, Dechert R. Tumor necrosis factor activity increases in the early response to trauma. *Acad Emerg Med*. 1997; 4(11):1035-40.
10. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 1995; 4:193-9.
11. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP, IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(3): G621-9.

12. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A, Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med 22.1999; 1262-1264.
13. Snyder EL. The role of cytokines and adhesive molecules in febrile non-hemolytic transfusion reactions. Immunol Invest 1995; 24:333-9.
14. Winkelstein A, Kiss JE. Immunohematologic disorders. Jama 1997; 278:1982-92.
15. Davenport R. Cytokines and erythrocyte incompatibility. Curr Opin Hematol 1994; 1:452-6.
16. Davenport RD. The role of cytokines in hemolytic transfusion reactions. Immunol Invest 1995; 24:319-31.
17. Zhu XL, Zellweger R, Zhu XH, Ayala A, Chaudry IH, Cytokine gene expression in splenic macrophages and Kupffer cells following haemorrhage, Cytokine. 1995; 7(1):8-14.
18. fong Y, Tracey KJ, . Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS., Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, Cermani CA, Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia, J.Exp. Med., 1989; 1;170(5):1627-33.
19. Robinson MK, Rounds JD, Hong RW, Jacobs DO, Wilmore DW. Glutathione deficiency increases organ dys- function after hemorrhagic shock. Surgery 1992; 112:140-7; discussion 8-9.

20. Sacks G, Sargent I, Redman C, An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*, 1999, 20(3):114-8
21. Muyan M. and Boime I., Secretion of chorionic gonadotrophin from human trophoblast. *Placenta*, 1997; 19(4):237-41.
22. Alexander H, Zimmermann G, Lehmann M, Pfeiffer R, Schone E, Leiblein S, Ziegert, M, HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy, *Domest Anim Endocrinol.*;1998; 15(5): 377-87.
23. Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, Benner R, Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol.*, 2001, 62(12):1315-23.
24. Cole LA, The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J. Clin Endocrinol metab.*,1993; 76(3)704-10.
25. Benner R, Khan NA. Dissection of systems, cell populations and molecules. *Scand J Immunol* 2005; 62 Suppl 1: 62-6.
26. Khan NA, Khan A, Savdlkdul HF, Benner R. Inhibition of septic shock in mice by an oligopeptide from the beta-chain of human chorionic gonadotrophin hormone. *Hum Immunol* 2002; 63:1-7.
27. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P,

Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003; 17:2474-2486.

28. Childs EW, Wood JG, Smalley DM, Hunter FA, Cheung LY. Leukocyte adherence and sequestration following hemorrhagic shock and total ischemia in rats. *Shock*. 1999;11(4):248-52.

29. Suenaeert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease, *Am J Gastroenterol*. 2002 ;97 (8):2000-4.

30. Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 350(21): 2167- 79.

31. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD, Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.*, 2000, 26 (1) 5124-8.

32. Jit M, Henderson B, Stevens M, Seymour RM, TNF-alpha neutralization in cytokine-driven diseases: a mathematical model to account for therapeutic success in rheumatoid arthritis but therapeutic failure in systemic inflammatory response syndrome. *Rheumatology*, 2005 Mar;44(3):323-31.

33. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP, IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver*

Physiol. 2003;285(3): G621-9.

34. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A, Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med 27:1999; 1262-1264.

35. Stites DP, Pavia CS, Clemens LE, Kuhn RW, Siiteri PK, Immunologic regulation in pregnancy, Arthritis Rheum. 1979 22(11):1300-7.

36. Saito S, Cytokine network at the feto-maternal interface, J Reprod Immunol., 2000, 47(2):87-103.

37. Puett D, Li Y, DeMars G, Angelova K, Fanelli F, A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein, Mol Cell Endocrinol. 2007 2;260-262:126-36.

38. Bai JPF, Subramanian P, Mosberg HI and Amidon GL, Structural requirements for the intestinal mucosal-cell peptide transport: the need for N-terminal α -amino group, 1991, Pharm Res 8: 593-599.

39. Yang R, Tan X, Thomas AM, Steppacher R, Qureshi N, Morrison DC, Van Way CW 3rd. Alanine-glutamine dipeptide (AGD) inhibits expression of inflammation-related genes in hemorrhagic shock. J Parenter Enteral Nutr. 2007;31(1):32-6.

Tabela 1. Primers e sondas usados para determinar níveis de transcrição para TNF- α , IL-6, ICAM-1 e GAPDH.

Transcrição de mRNA	Primer dianteiro	Primer inverso	Sonda	Tamanho do produto (bp)
TNF- α	F-RAT-TNF α -EMC	R-RAT-TNF α -EMC	T-RAT-TNF α -EMC	138
	TGCCTCAGCCTCTTCTC	GGTCTGGGCCATGGA	FAM-	
	ATTC	ACTG	CCACCAOGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG-TAMRA	
IL-6	F-RAT-IL6-EMC2	R-RAT-IL6-EMC2	T-RAT-IL6-EMC	158
	CAGAGGATACCACCCAC	GCCATTGCACAACTC	FAM-	
	AACAGA	TTTTCTCA	ACCAC TTCACAAGTCGGAGGCTTAATTACAT	
ICAM-1	F-RAT-ICAM1-EMC	R-RAT-ICAM1-EMC	ATGTTCT-TAMRA	153
	TGGGGAAGACAGCAGA	CAGCGCAGGATGAG	T-RAT-ICAM1-EMC	
	CCA	GTTCT	FAM-CACCACGCAGTCCTCGGCTTCTG-	
GAPDH	F-RAT-GAPDH-EMC	R-RAT-GAPDH-EMC	TAMRA	131
	GGATACCACCCACAACA	TTTTGGCCCCACCCT	T-RAT-GAPDH-EMC	
	GACCAGTA	TCA	FAM- ACTCCAGCATACTCAGCACCAGCATCA-TAMRA	

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de pelo menos um tetrapéptido isolado ou sintético seleccionado do grupo composto por LQGV, AQGV e LAGV e derivados funcionais destes, em que um resíduo de L-aminoácido é substituído por um D-aminoácido, ou um sal de adição ácido ou básico farmacêuticamente aceitável destes, para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento de um sujeito a sofrer ou que se considere estar a sofrer de trauma-hemorragia.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que o referido péptido é seleccionado do grupo composto por LQGV, AQGV e LAGV.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, compreendendo o uso de uma mistura de (i) um tetrapéptido seleccionado do grupo composto por LQGV, AQGV e LAGV e (ii) outro péptido capaz de reduzir os níveis de citocina pró-inflamatória num modelo animal de trauma-hemorragia ou choque hemorrágico.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o referido tetrapéptido é LQGV.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o referido tetrapéptido é AQGV.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o referido tetrapéptido é LAGV.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

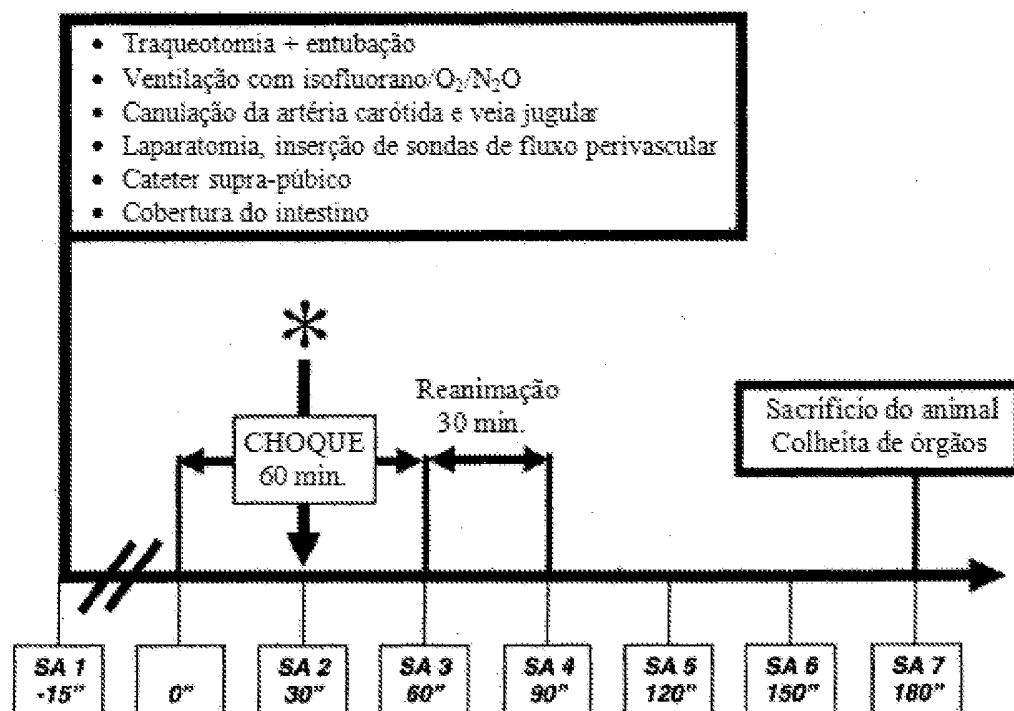
6, em que o referido tratamento de trauma-hemorragia também compreende fornecer ao referido sujeito sangue ou produtos de sangue, como eritrócitos (Ec.), plaquetas, plasma ou combinações destes.

Lisboa,

RESUMO

«TRATAMENTO DA HEMORRAGIA TRAUMÁTICA COM OLIGOPÉPTIDOS CURTOS»

São descritos métodos e meios associados para tratar um sujeito, por exemplo um mamífero, em choque hemorrágico ou que se considere estar em risco de choque hemorrágico. Estes métodos incluem administrar ao sujeito, de forma clinicamente aceitável, um oligopéptido curto como AQGV e/ou LQGV.



Modelo de Choque Hemorrágico (HS)

(* = hora de administração do péptido A, B ou C nos grupos péptido)

FIG. 1

Tensão arterial média em experiências placebo, choque e péptido A, B e C

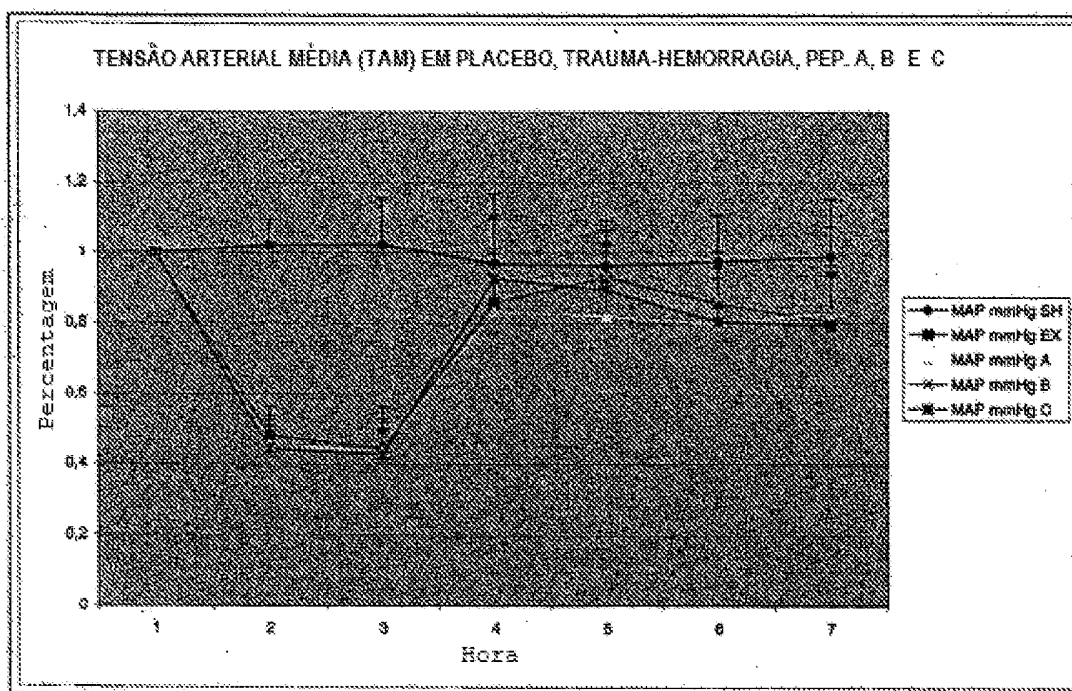


FIG. 2

Hematócrito em experiências placebo, choque e péptido A, B e C (da esquerda para a direita)

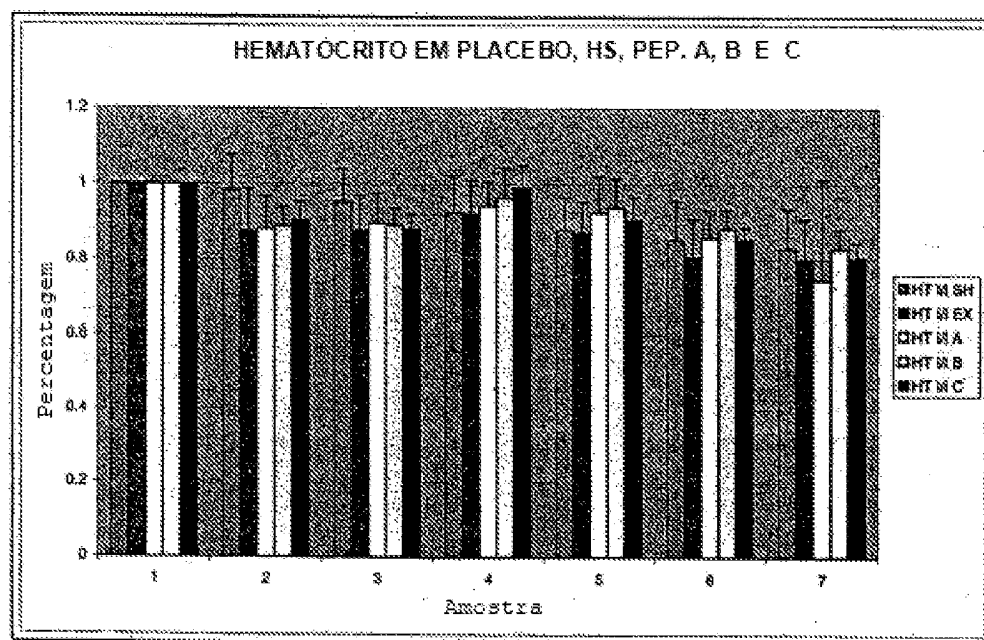


FIG. 3

LEUCÓCITOS durante experiências PLACEBO, TRAUMA-HEMORRAGIA, PEP. A, B E C

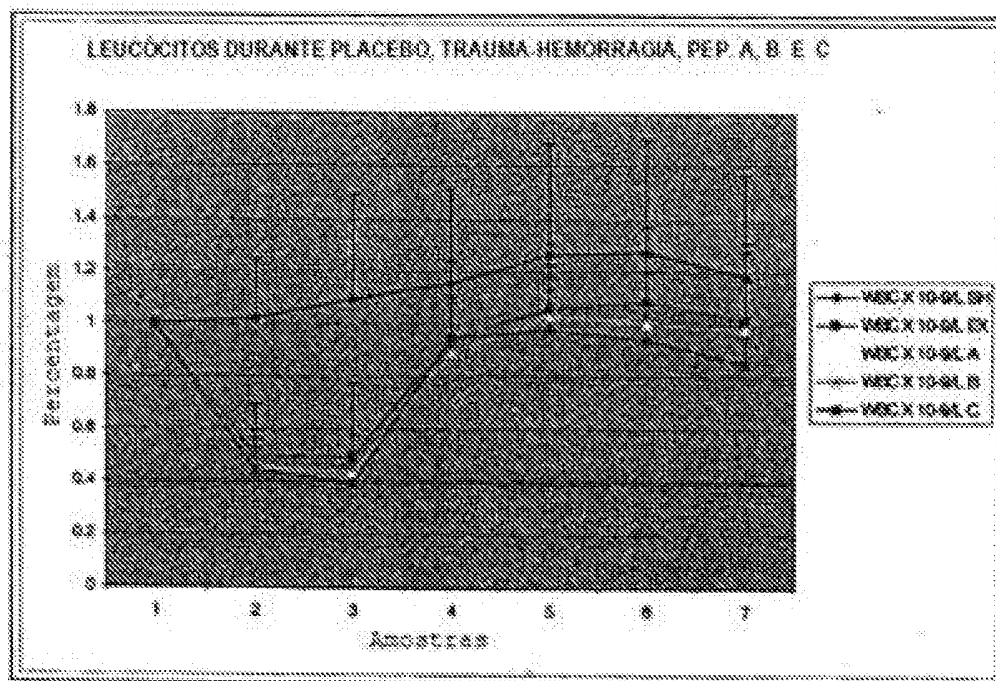


FIG. 4

Macrófagos (MO) e granulócitos (GR) em experiências placebo, trauma-choque hemorrágico e Péptido A, B e C (da esquerda para a direita)

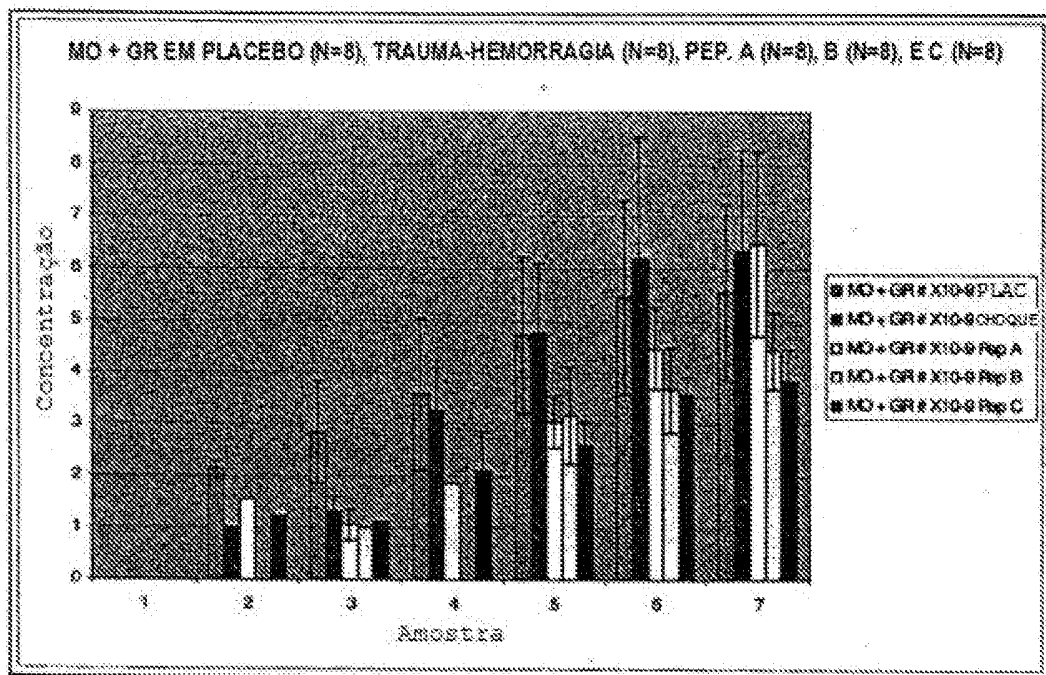


FIG. 5

Fluxo arterial em experiências placebo, choque e Péptido A, B e C
(da esquerda para a direita)

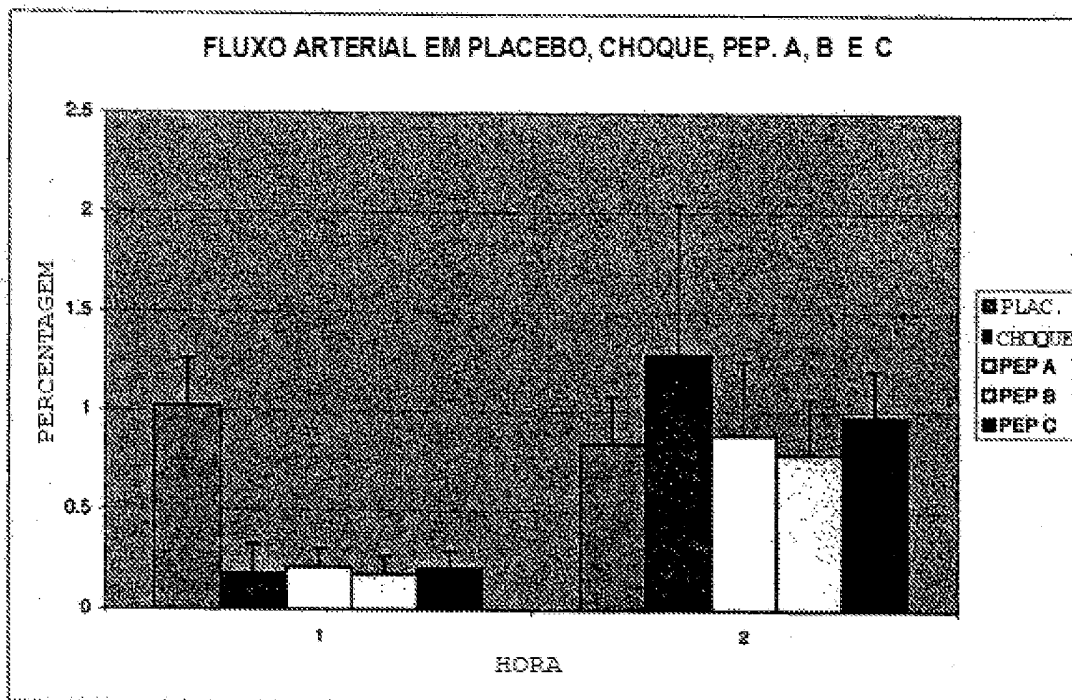


FIG. 6

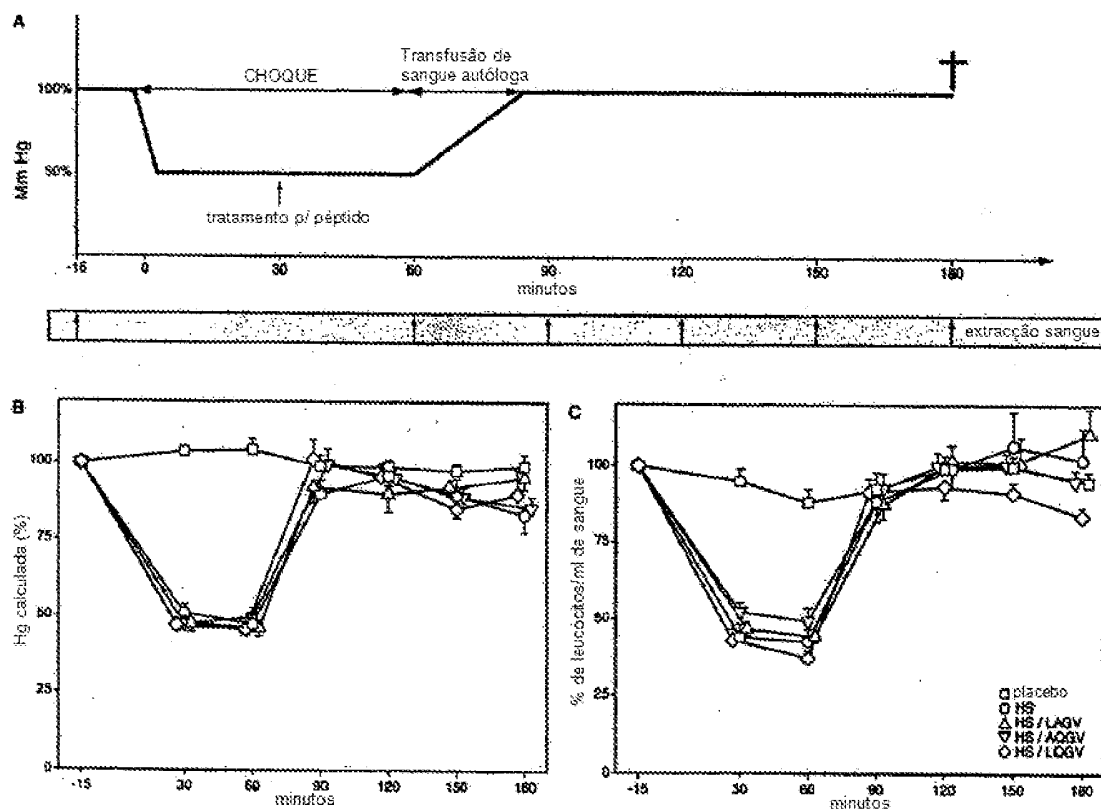


FIG. 7

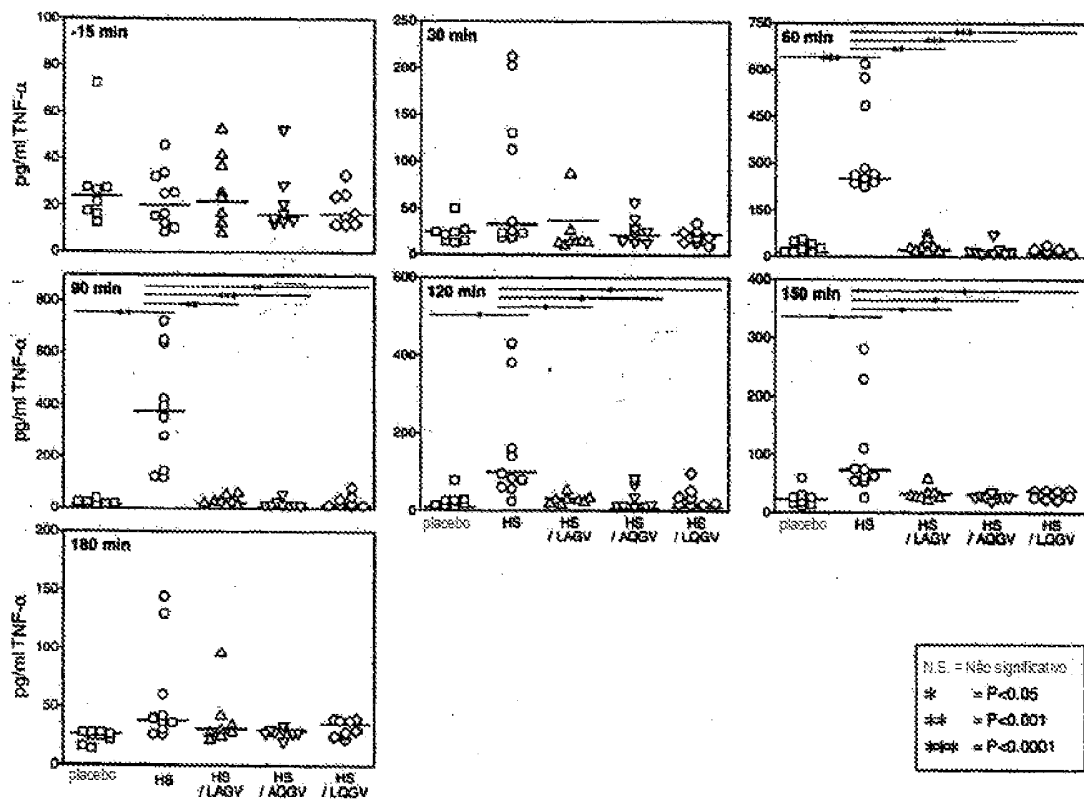
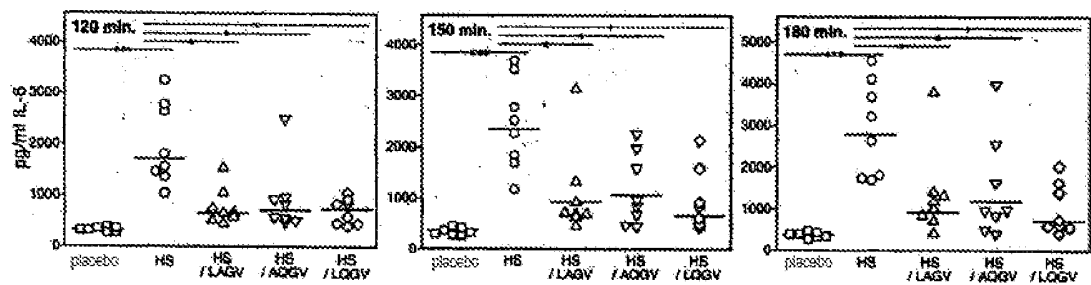
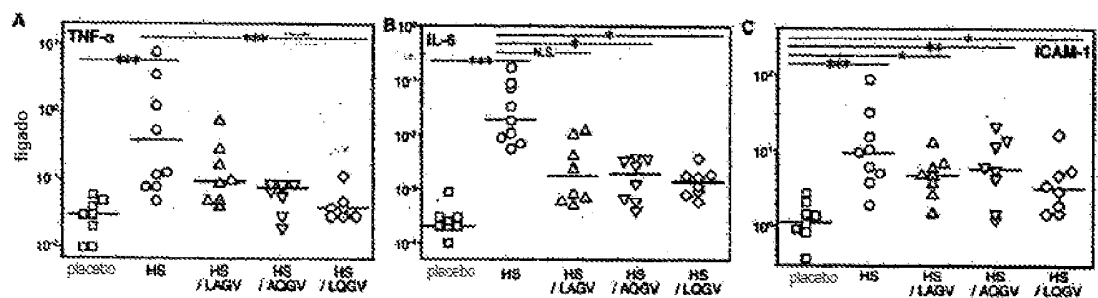


FIG. 8



N.S. = Não significativo * = $P < 0.05$ ** = $P < 0.001$ *** = $P < 0.0001$

FIG. 9



N.S. = Não significativo * = $P < 0.05$ ** = $P < 0.001$ *** = $P < 0.0001$

FIG. 10