

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
FUNDO DE INCENTIVO À PESQUISA – FIPE

**Efeito do antagonista do receptor de peptídeo liberador de gastrina na
resposta inflamatória por lesão de reperfusão pulmonar em ratos**

Vera Lorentz de Oliveira Freitas

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**Efeito do antagonista de receptor do peptídeo liberador de gastrina
na resposta inflamatória por lesão de reperfusão pulmonar em ratos**

Vera Lorentz de Oliveira Freitas

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre, 15 de Setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Rafael Roesler

PPGCM - UFRGS

Prof. Daniel Damin

PPG Ciências Cirúrgicas - UFRGS

Dr^a Daniela Cornélio

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Lorentz de Oliveira Freitas, Vera

O efeito do antagonista de receptor do peptídeo liberador de gastrina na lesão de reperfusão pulmonar em ratos / Vera Lorentz de Oliveira Freitas. 2014.

80 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Isquemia-reperfusão. 2. resposta anti-inflamatória. 3. apoptose. 4. lesão de reperfusão. 5. antagonista de GRPR. I. Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Resumo

A lesão de isquemia e reperfusão pulmonar (LIRI) é a principal causa de disfunção precoce do enxerto após o transplante pulmonar. Diferentes substâncias têm sido utilizadas na tentativa de proteger o pulmão na fase inicial pós-transplante e melhorar o desempenho do enxerto com pouco resultado tanto a curto quanto em longo prazo. O peptídeo liberador gastrina (GRP) está envolvido na indução de respostas imunes inatas adaptativas por induzir a quimiotaxia de mastócitos, migração de macrófagos e proliferação de células T e fibroblastos. Este agente foi capaz de proteger o dano tecidual em outros modelos experimentais de inflamação, incluindo sepsis pós-isquemia e perfuração de ceco, artrite e colite induzidos por drogas. O efeito protetor foi atribuído ao bloqueio na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como da interleucina -1 beta (IL-1 β) e TNF- alfa (TNF- α), e inibição de migração de mononucleares. Nesta tese o efeito protetor do antagonista do receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRPR), o RC-3095 (RC) endovenosamente administrado antes e depois da reperfusão foi estudado em modelo animal de LIRI. Vinte ratos Wistar foram randomizados em quatro grupos: (SHAM), Isquemia-reperfusão (IR), administração de RC Pré-IR (RC-Pré) e RC Pós-IR (RC-Pós). Após a reperfusão, os animais foram observados por 120 minutos. Foi realizada a análise histológica, com verificação de escala de lesão pulmonar, e imunohistoquímica para Caspase clivada - 9 e óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS). Expressão de IL-1 β e TNF- α foram quantificadas por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Uma redução significativa na pressão arterial média foi observada nos grupos IR e RC - Pré quando comparado com seus valores antes da reperfusão ($p < 0.001$). No final do experimento o grupo RC-Pós apresentou uma redução significativa na pressão arterial de oxigênio em relação ao início ($p=0.005$). Observou-se maior expressão de Caspase - 9 clivada no grupo RC-Pós ($p>0.013$), quando comparado aos demais grupos. Não houve diferença significativa na captação da eNOS entre os grupos ($p=0.206$). Os grupos RC - Pré e Pós mostraram discreta redução, não atingindo significância estatística, da IL-1 β ($p=0.159$) e TNF- α ($p= 0.260$), quando comparado com o grupo IR. Não houve diferença estatística entre as médias dos escores histológicos entre os diferentes grupos. e SHAM. Notavelmente, quando administrado após reperfusão parece potencializar dano celular estimulando a apoptose. Concluindo, a utilização do antagonista do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095, não produziu efeito protetor significativo na resposta inflamatória em pulmões de ratos. Estudos adicionais devem ser implementados para confirmar estes achados.

Palavras-chave: Isquemia-reperfusão; resposta antiinflamatória; apoptose; lesão de reperfusão; GRPR.

Abstract

Lung ischemia reperfusion injury (LIRI) is the main cause of early graft dysfunction and death after lung transplantation. Several methods and substances have been used as an attempt to protect the lung during the early phase after transplantation and improve graft performance at short and long term with limited results. The selective gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) antagonist RC-3095 (RC) was shown to protect from damage in various models of inflammation, including sepsis due to cecal ischemia and perforation, drug-induced arthritis and colitis, probably due to the inhibition in the release of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1-beta and TNF-alpha, as well as interference with mononuclear migration. In this thesis, the protective effect of the selective gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) antagonist RC-3095, administered intravenously before and after reperfusion was studied in an animal model of LIRI. A total of 20 Wistar rats were randomized in four groups: (SHAM), Ischemia-reperfusion (IR), RC Pre-IR (RC-Pre) and the RC Post-IR (RC-Post). The IR groups were submitted to a model of ischemia/reperfusion by clamping of the left pulmonary hilum for 45 minutes followed by reperfusion for 120 minutes. We recorded the hemodynamic parameters, blood gas analysis and histology. We analyzed Cleaved Caspase-9 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by immunohistochemistry. Expression of IL-1 β and TNF- α was evaluated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). We observed that the final mean arterial pressure significantly decreased in IR and RC Pre-IR compared to their values before reperfusion ($p < 0.001$). The RC-Post group showed significant decrease of partial pressure of arterial oxygen at the end of the observation compared to baseline ($p=0.005$). Caspase-9 activity was significantly higher in the RC-Post-IR as compared to the other groups ($p < 0.013$). No significant differences were observed of eNOS activity among the groups. The groups RC Pre-IR e RC Post-IR did not show a significant decrease of IL-1 β ($p=0.159$) and TNF- α ($p=0.260$), as compared to IR. The histological score showed no significant differences among the groups. Notably, its use after reperfusion seems to potentiate cell damage, stimulating apoptosis. In conclusion, RC3095, a selective GRPR antagonist failed to demonstrate a significant protective effect in our LIRI model in male Wistar rats. Further studies to address this question are warranted.

Keywords – Ischemia; Reperfusion; Apoptosis; anti-inflammatory response; lung injury; gastrin-releasing peptide receptor antagonist

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Esquema dos Grupos Experimentais	28
Fig. 2 – Fluxo da randomização	36
Fig. 3 – Imagens da lesão nos grupos	38
Fig. 3 – Gráfico dos escores histológicos.....	38
Fig. 4 – Gráfico da análise estatística IL1- β	39
Fig. 5 – Gráfico da análise estatística TNF- α	39
Fig. 6 – Gráfico da análise estatística da Caspase	39
Fig. 7 – Imagens da captação da Caspase nos grupos	39
Fig. 8 – Imagens da captação da eNOs nos grupos	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hemodinamica - análise dos grupos	75
Tabela 2 – Hemodinâmica - análise dos tempos.....	75
Tabela 3 – Planilha de observações de caspase eNOs	77
Tabela 4 – Planilha de observações de eNOs	78

Lista de Abreviaturas

ATP	adenosina trifosfato
BBS	bombesina
BLP	peptídeos relacionados à bombesina
CINC-1	citocina - induzida por quimiotaxia de neutrófilos
DAB	diaminobenzidina
DP	desvio padrão
DPE	disfunção primária do enxerto
ELISA	ensaio imunossorvente ligado à enzima
eNOS	enzima oxido nítrico - sintase endotelial
EP	erro padrão
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAMED	Faculdade de Medicina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL	interleucina
IL-1 β	interleucina - 1 beta
IL-6	interleucina - 6
IL-10	interleucina - 10
iNOS	enzima indutora de óxido nítrico
IQ	intervalo Interquartil
IR	isquemia – reperfusão
LBA	lavado bronco alveolar
min.	Minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mmHg	milímetro de mercúrio
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	oxigênio
P	pressão
PaCO ₂	pressão arterial do dióxido de carbono
PAM	pressão arterial média
PaO ₂	pressão arterial do oxigênio
PBS	tampão fosfato-salino
PFC	perfluorcarbono
Pg	picograma
μ g	micrograma
SEB	enterotoxina estafilocócica tipo B
t	tempo
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. ESTRATÉGIAS PARA SELECIONAR AS FORMAÇÕES ..	15
2.1.1. Aspectos sobre Isquemia e Reperfusão	16
2.1.2. Bombesina / Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP).....	17
2.1.3. Funções fisiológicas do GRP.....	18
2.1.4. Bombesina e seus receptores.....	19
2.1.5. Neuropeptídeos e Inflamação	20
2.1.6. RC-3095 – Antagonista do receptor de grp (GRPR)	21
2.1.7. Evolução dos estudos realizados nesse modelo experimental	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral	24
3. 2. Objetivos Secundários.....	24
4. MÉTODOS	25
4. 1. Animais e local da pesquisa.....	25
4. 2. Produto investigacional e dose administrada	26
4. 3. Desenho experimental	27
4. 4. Randomização dos grupos experimentais.....	28
4. 5. Eutanásia e coleta de amostras de sangue para análise funcional ...	29

4. 6. Amostras de tecido para histologia do pulmão.....	29
4. 7. Preparação dos extratos.....	30
4. 8. Quantificação de proteínas por ELISA	30
4. 9. Expressão proteica por imunohistoquímica.....	31
4. 10. Variáveis estudadas	32
4. 11. Considerações éticas.....	34
4. 12. Análise estatística dos dados	34
4. 13. Cálculo do tamanho amostral	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Atividade funcional dos pulmões	36
5. 2. Lesão de reperfusão pulmonar	38
5. 3. Expressão de citocinas inflamatórias	38
5. 4. Expressão da caspase	39
5. 5. Atividade da eNOS.....	40
6. ARTIGO CIENTÍFICO	41
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÕES	61
9. COMENTÁRIOS FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	

1. Introdução

O primeiro transplante pulmonar em seres humanos foi realizado nos Estados Unidos da América, na Universidade do Mississippi, em 1963, em um paciente portador de carcinoma de pulmão, que depois de 18 dias evoluiu a óbito. Após 20 anos, o grupo de transplante de pulmão de Toronto, Canadá, realizou a primeira cirurgia com sucesso. No Brasil, o primeiro transplante pulmonar foi realizado em Porto Alegre no ano de 1989¹.

As indicações para o transplante de pulmão estão bem definidas em protocolos estabelecidos pela *American Thoracic Society (ATS)*² e são universalmente aceitos. As principais condições que levam o paciente ao transplante pulmonar são a doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquiectasia, hipertensão pulmonar primária e síndrome de *Eisenmenger* (enfisema acompanhado ou não de deficiência de alfa-1 antitripsina). Atualmente, é uma opção terapêutica bem estabelecida para o doente de 65 anos ou menos, portador de pneumopatia terminal não neoplásica, com condição ambulatorial preservada e perfil psicossocial adequado, sem outras comorbidades, e sem alternativas terapêuticas - esse seria considerado candidato potencial ao transplante³.

No Brasil, o transplante pulmonar é o tratamento de escolha para pacientes com doenças pulmonares em fase terminal⁴. De acordo com dados fornecidos pelo Registro Brasileiro de Transplantes da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), no ano de 2013, realizamos 80 transplantes pulmonares no Brasil, com um significativo aumento de 55% nos últimos dois anos. Este número de transplantes foi realizado em apenas quatro estados com hegemonia do Rio Grande do Sul. Porém, recentemente, a ABTO emitiu um sinal de alerta divulgando uma queda preocupante do número de transplantes realizados no país. O transplante de pulmão, que já é realizado em menor número em relação aos outros órgãos, caiu 55% no primeiro trimestre de 2014⁵.

O sucesso do transplante pulmonar depende de vários fatores, como o tempo de isquemia tolerável mais reduzido do que para a maioria dos outros

órgãos, condições clínicas do receptor, além do próprio ato de implantação do enxerto⁶. Alguns eventos estão associados ao risco elevado do desenvolvimento da lesão de isquemia - reperfusão (IR), como a necessidade de circulação extracorpórea no intra-operatório, o uso de hemoderivados, o tempo de isquemia dos enxertos superior a 6 horas, e a utilização de pulmões de doadores considerados não ideais. As soluções de preservação pulmonar com elevado conteúdo de potássio também estão relacionadas na gênese da lesão de IR⁷.

A lesão de IR compreende uma série de fenômenos que decorrem da recirculação do sangue (reperfusão) em um órgão cuja circulação sanguínea foi interrompida temporariamente (isquemia). O produto final desta sequência de eventos será a alteração da permeabilidade capilar cuja graduação será diretamente proporcional ao grau do dano isquêmico o qual, por sua vez, pode variar do edema intersticial até a ruptura vascular com hemorragia, também caracterizada por edema pulmonar e extravasamento de neutrófilos⁸.

Vários estudos sugerem um papel central das espécies reativas de oxigênio (ERO) na lesão por isquemia e reperfusão⁹, que está marcada pelo aumento das ERO e de outros radicais livres, podendo ter papel crucial na sucessão de eventos que levam à falência pulmonar¹⁰. Nos pulmões, as ERO estão relacionadas à ativação de processos inflamatórios por meio de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear – kappa B (NF-kB), estimulando o remodelamento de cromatina e a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios¹¹.

A lesão de IR que, em sua forma clínica grave, é também conhecida como disfunção primária do enxerto (DPE) é um obstáculo ao sucesso dos transplantes pulmonares estando associada à elevada morbimortalidade nos primeiros dias após o transplante e, a médio e longo prazo, ao desenvolvimento de bronquiolite obliterante, como forma de rejeição crônica, que ocorre em 15 a 25% dos casos. A sobrevida dos transplantados no primeiro ano é de 67%¹².

Diversas estratégias têm sido adotadas para minimizar os efeitos da lesão de IR sobre os pulmões transplantados, com destaque para o pré-condicionamento do enxerto a ser implantada¹³, a utilização de solução de preservação com baixo conteúdo de potássio¹⁴ e o uso de drogas tanto em

caráter clínico quanto experimental¹⁵. Estudos se concentraram em adicionar substâncias, tais como prostaglandinas¹⁶ às soluções de preservação e no momento da reperfusão dos enxertos pulmonares, aplicação de ventilação líquida parcial¹⁷, o uso de substâncias antioxidantes, como a N-Acetilcisteína¹⁸, e, mais recentemente, de substâncias antiinflamatórias, como inibidores do peptídeo ativador de plasminogênio¹⁹ e inibidores da elastase neutrofílica²⁰.

O desenvolvimento da lesão de IR pulmonar, além de ser responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade, está sendo associada ao prolongamento da duração da ventilação mecânica e do tempo de permanência, quer nas unidades de cuidados intensivos, quer nas unidades hospitalares. A lesão de IR do pulmão tem, portanto, um impacto significativo na recuperação do estado de saúde dos doentes e, conseqüentemente, no aumento do consumo dos recursos de saúde¹².

A utilização de novas moléculas com potencial antioxidante e/ou anti-inflamatório na lesão de reperfusão pulmonar vem sendo exploradas e demonstra ser um racional importante na busca de novas alternativas terapêuticas que possam aumentar o sucesso do transplante pulmonar.

O RC-3095 é um peptídeo sintético com ação antagonista do GRPR. Nosso grupo de pesquisa tem estudado este agente e seus efeitos antitumorais, inclusive com uma avaliação inicial de segurança em participantes de pesquisa com neoplasias sólidas avançadas²¹.

Além disso, resultados obtidos por nosso grupo²² e outros²³ sugerem que o RC-3095 possa reduzir morbidade e mortalidade em modelos de sepse²² em roedores, após indução de isquemia e perfuração de ceco bem como artrite²⁴, colite²⁵ e uveíte²⁶ induzida por agentes químicos.

Baseado na hipótese que o RC-3095 possa interferir em processos inflamatórios envolvidos na gênese da IR, serão descritos nesta tese os resultados obtidos em um estudo exploratório com o agente em um modelo experimental de lesão induzida por clampeamento da artéria pulmonar em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura observará os principais aspectos relacionados e implicações que ocorrem durante o processo de isquemia e reperfusão, principalmente no contexto da lesão de reperfusão pulmonar em modelo experimental. Também revisamos o papel do RC-3095, aspectos sobre a molécula e os resultados encontrados em diversos estudos com animais e clínicos. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Pubmed, SciELO e banco de teses da Capes, no período de 1997 a 2014. Foram realizadas buscas através dos termos “*Lung Ischemia-reperfusion, Injury, inflammatory process, drug therapy e combinações*”.

2. 1. 1. Aspectos sobre Isquemia e Reperfusão

Uma determinada área ou tecido está sujeito à isquemia quando se verifica uma interrupção ou deficiência no fornecimento sanguíneo, resultando um aporte insuficiente de oxigênio e nutrientes durante um determinado período de tempo. A isquemia é, assim, causa de disfunção e morte de tecido em várias situações clínicas, sendo que as suas consequências poderão ser completamente ou parcialmente reversíveis ou irreversíveis conforme o tipo de tecido, a intensidade e o tempo ao qual esteve sujeito a isquemia ²⁷.

O restabelecimento do fluxo sanguíneo, após um período de isquemia, é designado de reperfusão²⁸.

O termo lesão de IR, também designado lesão de reperfusão, é utilizado para definir alterações funcionais e estruturais resultantes da reperfusão de tecidos isquêmicos, inicialmente viáveis²⁹.

Embora a restituição do fluxo sanguíneo ao tecido isquêmico seja inequivocamente essencial na prevenção de danos celulares irreversíveis, evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que as principais

disfunções celulares e teciduais observadas se relacionam com a reperfusão. Ao longo dos anos, a lesão de IR tem sido alvo de investigação em diferentes órgãos, como o intestino, rins, coração e cérebro, entre outros. Nestes órgãos, a isquemia resulta em hipóxia ou anóxia do tecido, e diversos estudos referem um agravamento das lesões produzidas pela isquemia após a reintrodução do aporte de oxigênio³⁰. É também importante salientar que a lesão de IR, além de afetar o órgão sujeito a isquemia, pode também estender-se a outros órgãos à distância. A lesão pulmonar causada por IR intestinal é um dos exemplos dessa situação³¹.

A fisiopatologia da lesão provocada por IR compreende uma série de mecanismos complexos. Durante a isquemia, verifica-se um acúmulo de metabólitos tóxicos, provenientes da degradação de ATP. Na fase de reperfusão, as liberações desses metabólitos, em conjunto com a reoxigenação, promovem, por meio de reações enzimáticas, a formação de espécies reativas de oxigênio³². Ainda na fase de reperfusão, observa-se o desenvolvimento de uma cascata inflamatória e o consequente envolvimento do sistema imunológico, o que resulta na ativação do endotélio vascular, aumento da sua permeabilidade, expressão de moléculas de adesão e de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, fatores de ativação plaquetária, leucotrienos, selectinas, endotelinas), ativação da cascata do complemento e mobilização de leucócitos polimorfonucleares³³⁻³⁵.

Considerando especificamente a IR do pulmão, é importante salientar que esta difere fisiologicamente daquela que se observa em outros órgãos. A isquemia pulmonar não resulta obrigatoriamente em hipóxia ou anóxia do tecido, pois as células do tecido pulmonar têm a capacidade de utilizar o oxigênio proveniente das trocas gasosas alveolares, se a ventilação se mantiver. Assim, a IR pulmonar não é sinônimo de anoxia-reoxigenação, apesar de também originar espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, lesões oxidativas³⁶.

Vários estudos sugerem um papel central das espécies reativas de oxigênio (ERO) na lesão por IR que está marcada pelo aumento das ERO e de outros radicais livres, podendo ter papel crucial na sucessão de eventos que

levam à falência pulmonar³⁷. Acredita-se que a lesão de IR seja decorrente de um aumento das ERO, as quais desencadeiam uma resposta do enxerto resultando em uma ativação da resposta imune adaptativa (rejeição aguda) por meio da ativação de células apresentadoras de antígeno³⁸. ERO são produtos do metabolismo normal da célula. As maiores fontes desses radicais são a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o retículo endoplasmático e a nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH/NADPH) oxidase associada à membrana. Em baixas concentrações, as ERO atuam como mediadores fisiológicos de resposta celular e reguladores da expressão gênica. Em altas concentrações, podem gerar uma cascata bioquímica, produzindo lipoperoxidação, oxidação de proteínas, dano de DNA, morte celular e contribuir para a ocorrência de situações patológicas³⁹. A produção de ERO intracelulares tem sido observada em vários tipos celulares do tecido pulmonar⁴⁰, incluindo células endoteliais⁴¹, epiteliais alveolares do tipo II, células claras, epiteliais ciliadas e macrófagos alveolares⁴².

Contudo, o tempo de isquemia tolerável pelo pulmão é de apenas 4 a 7 horas, bastante mais reduzido do que para a maioria dos outros órgãos, como rim, fígado ou coração, que reforça a necessidade de aprofundar as alterações celulares que ocorrem no tecido pulmonar a cerca da ocorrência de IR. No campo da cirurgia torácica, os mecanismos responsáveis pela lesão de IR do pulmão ocorrem frequentemente após *bypass* cardiopulmonar, tromboendarterectomia, ressecção (lobectomia, segmentectomia e pneumonectomia) e transplante pulmonar que é, indubitavelmente, a situação clínica que melhor representa a lesão de IR do pulmão¹⁷.

2. 1. 2. Bombesina / Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP)

A bombesina (BBS) é um peptídeo primeiramente isolado por Anastasi e colaboradores a partir da pele dos sapos *Bombina bombina* em 1971⁴³. Estudos imuno-histoquímicos mostraram a presença da BBS-imunorreatividade no sistema nervoso central (SNC) e trato gastrointestinal em várias espécies, incluindo ratos, porcos, cachorros e humanos. Contudo, a imunorreatividade não é somente devida a BN como também aos peptídeos relacionados: GRP,

decapeptídeo neuromedina-B (NM-B) e neuromedina C (NM-C)⁴⁴. Todos esses peptídeos fazem parte da família dos BLP. Um análogo mamífero da bombesina, com potente atividade liberadora de gastrina, o GRP, foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos⁴⁶. Esse peptídeo apresenta 27 aminoácidos e é estruturalmente homólogo à BBS de anfíbios, tendo em comum nove dos dez aminoácidos da porção carboxiterminal. Estudos direcionados ao GRP têm mostrado que o mesmo encontra-se em vários tecidos de diversas espécies de mamíferos, incluindo trato gastrointestinal (Bjornskov-Bartholdy, Bersani e Holst, 1991), glândula pituitária (Larsen *et al.*, 1989), trato geniturinário e articulações (Chu *et al.*, 1995), medula espinhal (Fuxe *et al.*, 1983), gânglios simpático e sensorial (Panula *et al.*, 1983; Helen *et al.*, 1984), glândula adrenal (Lemaire *et al.*, 1986), pulmão (McKillop *et al.*, 1990), tireóide (Conlon *et al.*, 1998), e cérebro (Hernanz A, 1990)..

2. 1. 3. Funções fisiológicas do GRP

O GRP possui importante papel em várias atividades biológicas, tais como crescimento tecidual⁴⁷, modulação do trato gastrointestinal, SNC, trato respiratório e resposta imune. Relacionado ao crescimento celular do tecido normal e neoplásico, os efeitos foram estabelecidos na mucosa intestinal normal⁴⁸, pâncreas⁴⁹, neoplasias do pulmão⁵⁰, próstata⁵¹, estômago⁵², cólon⁵³, mama⁵⁴ e através da mediação dos receptores de membrana específicos nas células-alvo⁵⁵.

Relacionado ao trato gastrointestinal, o GRP modula a secreção gástrica e pancreática através da ativação das células G e consequente liberação de colecistocinina e gastrina, regulando a secreção do ácido gástrico e funções motoras na musculatura estomacal (Ghatei, 1982). No pâncreas, estimula a liberação de neurotensina, motilina, peptídeo pancreático, insulina e glucagon (Minamo, 1983). No SNC, tem sido envolvido na modulação da saciedade (McCoy e Avery, 1990), termorregulação (Brown, Carver e Fisher, 1988), homeostase, ritmo circadiano (Albers, 1991), metabolismo (Hill e McDonald,

1992) e na participação em desordens psiquiátricas e neurológicas desempenhando papel neuroimunoregulatório importante na patogenia da ansiedade, depressão, esquizofrenia, autismo e demência⁵⁶.

Finalmente, o GRP, assim como outros BLP, está envolvido em diversas funções fisiológicas, tanto em animais como em culturas de tecido⁴⁸⁻⁵⁴ desde o crescimento de células e diferenciação de epitélios derivados de tumores⁵⁴ até o desenvolvimento e regulação da resposta imune através de ações diretas sobre as células do sistema imunológico, como a ativação de processos inflamatórios a partir da migração de macrófagos *in vivo*⁵⁵.

2. 1. 4. Bombesina e seus receptores

O GRPR é uma proteína de superfície celular ligante com alta afinidade a BSS, GRP, assim como a peptídeos intimamente relacionados. O GRPR, clonado no início da década de 1990, desencadeia alterações intracelulares que influenciam o comportamento celular⁵⁴, interage com proteínas G e ativa a liberação de inositol-trifosfato, com aumento do cálcio iônico intracelular⁵⁵. Esses receptores apresentam uma ampla distribuição no SNC e no tecido periférico, incluindo o trato intestinal de murinos, suínos, caninos e em seres humanos. São encontrados em altos níveis no músculo liso (intestino, estômago e bexiga) e em glândulas secretoras, como o pâncreas, por exemplo. Também é encontrado em várias linhagens celulares como, por exemplo, fibroblastos de Swiss 3T3, carcinoma de pulmão de pequenas células⁵⁰.

Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais expressam o receptor GRP. A ativação do receptor do GRP tem efeitos imunológicos, incluindo quimioatração de macrófagos peritoneais, monócitos e linfócitos⁵⁷, ativação de células *natural killer* (NK)⁵⁸ e citotoxicidade dependente de anticorpos⁵⁹. Além disso, induz a proliferação de mastócitos e quimiotaxia *in vitro*, sendo implicado na patogenia de doenças pulmonares⁶⁰ e artrite reumatóide⁶¹.

O GRP e o GRPR são expressos de forma aberrante em células tumorais e o GRP tem sido considerado um dos mais importantes fatores de crescimento tumoral⁵⁴. Estudos demonstraram em modelos tumorais distintos e em estudos com seres humanos que a via de ativação do GRP e seu receptor co-estimulam vias de proliferação celular e da angiogênese, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento vascular (VEGF), quinases (Akt, mTOR) entre outras⁶². Estas vias de sinalização celular estão envolvidas em eventos inflamatórios ativados durante a lesão vascular, como as lesões que ocorrem em processos isquêmicos⁶³.

2. 1. 5. Neuropeptídeos e Inflamação

Neuropeptídios são peptídeos liberados por neurônios que atuam como mensageiros intracelulares exercendo inúmeras funções modulatórias do sistema nervoso. O espectro da sua ação é restrito, isto se dá de acordo como o tipo de neuropeptídeo e o local da ação⁶⁴. A evidência do seu envolvimento em doenças inflamatórias tem focalizado predominantemente no papel pro inflamatório da substância P⁶⁵, GRP⁶⁶ e nociceptina/orphanina FQ⁶⁷, bem como efeito imunomodulador do peptídeo Y⁶⁸ e atividade anti inflamatória do peptídeo vasoativo intestinal (VIP)⁶⁹. Dessa forma, o mecanismo de ação dos neuropeptídios na modulação das doenças inflamatórias é, em grande parte, pela influência na produção de citocinas.

O neuropeptídeo GRP está envolvido na indução de resposta imune inata e adaptativa por induzir a quimiotaxia de mastócitos, migração de macrófagos e proliferação de células T e fibroblastos^{70, 71}. Muitas doenças pulmonares inflamatórias agudas e crônicas estão associadas com hiperplasia de células neuroendócrinas pulmonares (PNEC) e/ou níveis elevados de peptídeos derivados de PNEC⁵¹. Essas células epiteliais das vias aéreas secretam neuropeptídeos bioativos incluindo GRP, que afeta a proliferação e diferenciação celular, regulando aspectos da função neuroendócrina quando ligado a seu receptor, o GRPR^{72,73}. No entanto, a expressão excessiva do neuropeptídeo GRP e de seu receptor podem promover alterações fisiológicas e estarem relacionadas ao desencadeamento de doenças⁷¹. Quando

macrófagos são ativados, secretam GRP, que por sua vez exerce uma função importante entre as células do sistema imune no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Neste contexto o RC-3095, foi abordado em estudo com animais demonstrando um potencial efeito anti-inflamatório⁷⁴.

2. 1. 6. RC - 3095 – Antagonista do GRPR

O antagonista da BN, RC-3095, foi sintetizado através de uma técnica de fase sólida da resina benzidrilamina no laboratório de Shally (Universidade de Tulane, *New Orleans*)⁷⁵. Na posição 6, a forma D do análogo Trp 2, 3, 4, 9 tetrahydro-1H-pirido (3,4-b) ácido indol-3-carboxílico (Tpi) foi introduzida no nonapeptídeo Leu 13 ψ (Ch₂-NH) Leu 14-Bombesina. A redução da ligação peptídica entre a posição 13 e 14 foi introduzida utilizando-se uma reação de alquilação redutiva⁷⁶. O antagonista da BN foi sintetizado como dois diferentes sais. O D-212663 é um sal trifluór-acetato e o D-22213 é um sal acetato⁷⁷.

Diversas pesquisas mostram que a meia-vida de peptídeos relacionados a BLP, como o GRP, é muito curta na circulação, devido a sua rápida metabolização. Assim, os efeitos de BN, GRP e seus antagonistas aparecem rapidamente mais são relativamente de curta duração. Estudo *in vivo* mostra que a meia-vida de vários antagonistas da BN/GRP estão entre 154 e 1.388 minutos⁷⁸. Experimentos em modelos animais demonstraram que níveis de RC-3095, no sangue, decrescem rapidamente após injeção intravenosa ou subcutânea, decaindo rapidamente e tornando-se indetectáveis após 3-5 horas⁷⁹. Quando administrado pela via cutânea, os efeitos do RC-3095 são obtidos em 15-30 minutos após a injeção e terminando em poucas horas. Observa-se inibição significativa da liberação da gastrina diminuindo a elevação de glicose no plasma, causada pelo GRP⁸⁰.

Em relação ao perfil de segurança, estudo clínico de fase I em sujeitos com diferentes tipos de câncer em estágio avançado não demonstrou nenhuma reação adversa significativa, mesmo em doses mais elevadas que variaram entre 8 a 96 μ g/Kg⁷⁴.

O RC-3095 vem sendo estudado nos últimos anos em uma abordagem exploratória a fim de elucidar o seu mecanismo de ação como agente na cadeia anti-inflamatória. Os efeitos do RC-3095 foram demonstrados em

modelos bem estabelecidos de sepse experimental de ligação e perfuração cecal (CLP) e dano pulmonar agudo⁸¹. Nesses modelos propostos, o RC-3095, melhorou as taxas de sobrevivência reduzindo a insuficiência orgânica e o infiltrado inflamatório. Além disso, modulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) por macrófagos ativados, bloqueando diversos processos associados à progressão da sepse.

Em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante completo de *Freund* em ratos, o RC-3095 exerceu significativa inibição na inflamação articular diminuindo os níveis séricos de IL-1 β , TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) em relação ao grupo controle⁸². Em outro estudo com modelo animal de colite ulcerativa, também verificou a sua atividade anti-inflamatória associada com a redução de TNF- α na expressão colônica²⁵.

Outro recente estudo de 2012 demonstrou que houve a diminuição da inflamação em culturas de macrófagos peritoneais seletivamente para interleucinas pró-inflamatórias e TNF- α e não para IL-10, que é anti-inflamatória, sob a ação do RC-3095. De forma interessante, o RC-3095 atua exercendo uma quimiotaxia na fase inicial do processo inflamatório recrutando neutrófilos a partir da migração de macrófagos *in vivo*⁵³.

2. 1. 7. Evolução dos estudos realizados nesse modelo experimental

Como já referido anteriormente, o transplante pulmonar é a situação clínica que melhor representa a ocorrência da lesão de IR em pulmão. Dado que este procedimento se tem revelado benéfico e é cada vez mais utilizado na terapêutica de muitas doenças pulmonares crônicas, torna-se indispensável a otimização de abordagens farmacológicas que permitam reduzir os efeitos nefastos da lesão de IR pulmonar, que caracteriza este tipo de transplantes. Embora existam algumas terapêuticas já utilizadas na prática clínica, como o surfactante pulmonar, os corticosteroides e a ventilação, a maioria das abordagens farmacológicas encontram-se ainda em fase de investigação.

Desde 1993 o grupo do HCPA desenvolveu e vem aperfeiçoando o modelo experimental de transplante pulmonar unilateral em cães utilizando doadores depois de parada cardiocirculatória e tempo de isquemia

normotérmica de 3 horas. Estudos prévios permitiram-nos avanços significativos na investigação, desde técnicas de preservação do enxerto até aplicação de ventilação líquida parcial na busca de reduzir as sequelas da lesão de IR⁸³.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que a lesão de IR ocorre em um padrão bifásico. A fase inicial da reperfusão depende primariamente das características do doador, que ocorre nas primeiras 6 horas, a fase mais tardia, até 72 horas após, depende de fatores ligados às condições do receptor⁸⁴. Baseados nessas constatações, vários estudos se concentraram em adicionar substâncias, tais como prostaglandinas, às soluções de preservação e no momento da reperfusão dos enxertos pulmonares, no intuito de se minimizarem estes efeitos⁸⁵.

O presente experimento tem de caráter exploratório, pois não está baseado em nenhum modelo de investigação anterior sobre o efeito do RC-3095 no contexto da lesão de reperfusão pulmonar. Experiências anteriores com este modelo experimental possibilitaram-nos avaliar a natureza da influência sem a interferência de fatores relacionados ao doador. Além disso, baseado em estudos anteriores, verificamos que o tempo de 45 minutos de I/R seria o melhor momento para avaliar o efeito pré e pós da intervenção, assim como o tempo de 120 minutos para analisar sua influência sob o sistema imunoregulatório e sobre a via apoptótica⁸⁶.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Elucidar os efeitos da administração do RC-3095 em um modelo de lesão de isquemia e reperfusão pulmonar em ratos.

3.2. Objetivos Secundários

a) Avaliar o desempenho funcional dos pulmões por medidas hemodinâmicas e gasométricas durante o experimento nos diferentes subgrupos;

b) Realizar análise histológica através da técnica de hematoxilina-eosina e uso de escala de lesão pulmonar, no tecido pulmonar obtido dos diferentes subgrupos;

c) Analisar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias interleucina - 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), através do teste de Elisa em extratos do tecido pulmonar;

d) Analisar a atividade da enzima sintase do óxido nítrico (eNOS) no tecido pulmonar através da técnica de imunohistoquímica;

e) Avaliar a atividade Caspase clivada - 9 no tecido pulmonar através da técnica de imunohistoquímica.

4. MÉTODOS

4. 1. Animais e local da pesquisa

Este estudo foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Centro de Pesquisa Experimental, após a aprovação pela Comissão de Ética no uso de Animais/HCPA.

Foram estudados 20 ratos da linhagem Wistar sadios, machos, adultos jovens, o que corresponde a uma idade em torno de oito semanas, com peso médio de 360g adquiridos do biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

Os animais foram pesados no dia da chegada, mantidos em ambiente com temperatura controlada de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7 às 19 horas), com oferta de água e ração à vontade. Durante todo o período do estudo, foi oferecida ração da marca Nuvilab[®] com a seguinte composição: proteína bruta de 22% a 22,5%, gordura de 4,4% a 4,65%, Carboidrato de 53% a 55% e um total de energia metabolizável de 2.950 Kcal/Kg. No período de ambientação, os animais não foram submetidos a nenhum procedimento invasivo ou gerador de estresse e foram utilizados após o período de quarentena.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a lei 11.794/08 conforme regulamento local e normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GOLDIM, 1997). Todos os animais receberam tratamento de acordo com os “Princípios de cuidados com Animais de Laboratório” formulados pela *National Society for Medical Research* dos EUA e “Guia para Cuidados e uso de Animais de Laboratório” publicado pelo *National Institute of Health* (NIH, Edição em Português 1996).

Os animais foram submetidos à indução anestésica com uma máscara onde utilizamos o fluxo de O₂ de 0,5 L/min e de isoflurano de 100 mL/min. Os animais foram heparinizados sistemicamente (1 mg/kg) via parenteral, sendo submetidos a traqueostomia cervical com cânula plástica (*Abbocath*[®] n° 14; *Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA*) e a anestesia foi mantida sob essa

via, com um fluxo de O₂ de 0,2 L/min e de isoflurano de 10 mL/min. A ventilação mecânica (VM) foi instalada em ventilador volumétrico (Harvard *Rodent Ventilator*, modelo 683; *Harvard Apparatus Co.*, Millis, MA, EUA), com volume corrente = 10 mL/kg de peso corporal, frequência = 70-80 ciclos/min, fração inspirada de oxigênio = 0,2 (ar ambiente). Um microscópio cirúrgico (*Carl Zeiss, Oberkochen*, Alemanha) foi utilizado na dissecação das estruturas hilares e na canulação arterial (*Sirecust 730 Siemens, Solna, Sweden*). Após a traqueostomia e a canulação da carótida direita foi realizada uma toracotomia esquerda no quinto espaço intercostal, o ligamento pulmonar foi seccionado e o ápice do pulmão esquerdo tracionado caudalmente com o auxílio de uma haste flexível com ponta de algodão. Em seguida, a artéria pulmonar esquerda foi isolada para clameamento do pedículo pulmonar por 45 minutos. (*Vicca Neuroclip*, Cachoeirinha, RS, Brasil). A análise de gasometria arterial foi realizada para avaliar o potencial respiratório dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico após a instalação da ventilação mecânica, ao término do período isquêmico e ao final do tempo de 120 minutos. A cada clameamento arterial foi realizada expansão pulmonar por oclusão da válvula expiratória por 3 ciclos inspiratórios, com o objetivo de evitar colapso alveolar. Para esta análise, gases arteriais foram aspirados 0,1 mL de sangue arterial via punção da carótida. A análise dos gases arteriais foi realizada através de máquina de gasometria (*Radiometer ABL 5 Copenhagen*) em três tempos: t_0 (*baseline*) 15 minutos após a instalação da ventilação mecânica, t_2 (45 minutos) ao término do período isquêmico e t_3 (120 minutos) ao final do tempo reperfusão.

4. 2. Produto Investigacional e dose administrada

O antagonista do GRPR, RC-3095 (D-Tpi6, Leu13 psi (CH₂NH)Leu14-bombesin) foi cedido pela Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA sob a responsabilidade do Prof. Gilberto Schwartzmann. A dose utilizada no estudo foi determinada com base em dados da literatura e de experimentos já realizados pela equipe de oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O RC-3095 foi diluído em alíquotas de 0,3 mg em 1mL de água destilada pela Central de Misturas Intra Venosa (CMIV) do HCPA e foi administrado na

veia jugular interna, 15 minutos antes do clampeamento (grupo RC-Pré) e após 45 minutos de reperfusão (grupo RC-Pós).

4. 3. Desenho Experimental

Estudo, randomizado, delineado com a mesma metodologia utilizada em ensaios clínicos. Além dos pesquisadores, todos os integrantes da equipe de investigação que realizaram as análises não possuíam essa informação. Todas as pessoas que trabalharam no estudo desde o preparo das amostras, quantificações de proteínas, observações das lâminas até a análise estatística dos dados desconheciam a condição dos grupos. O experimento foi assim conduzido com o objetivo de evitar fatores que poderiam interferir nas observações qualitativas e quantitativas das diferentes técnicas utilizadas.

Os grupos controle e aqueles que receberam a intervenção foram mascarados e numericamente representados de 1 – 4, depois foram denominados como segue de agora em diante:

1. Simulação da cirurgia (SHAM);
2. Isquemia - reperfusão (IR);
3. Administração anterior a IR (RC-Pré);
4. Administração posterior a IR (RC-Pós).

O modelo experimental tem caráter exploratório comparativo, em material biológico proveniente de um modelo animal de lesão de isquemia e reperfusão, por clampeamento da artéria pulmonar esquerda, testando a influência de um produto investigacional (PI) endovenoso sob a lesão de reperfusão pulmonar. O RC-3095, um antagonista do receptor de GRPR, doravante denominado (RC) foi administrado 15 minutos antes do clampeamento e 45 minutos após reperfusão.

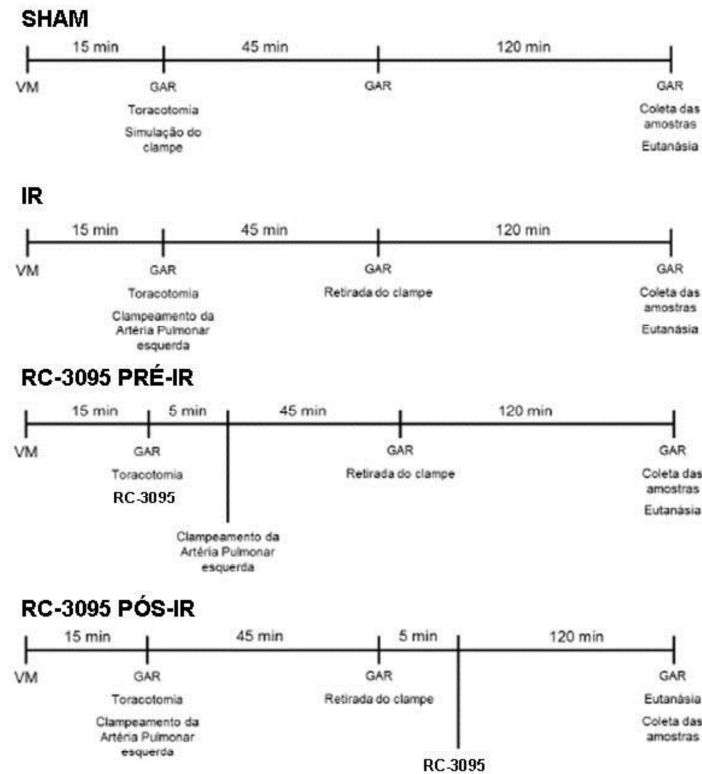


Figura 1. Esquematização dos grupos experimentais. VM – ventilação mecânica; min. – minutos; GAR – Gasometria Arterial; RC 3095 – antagonista de GRPR.

4. 4. Randomização dos grupos experimentais

O processo de randomização foi realizado seguindo o critério de listagem designando a entrada aleatória dos animais em um dos quatro grupos: 1. Controle (SHAM), 2. Isquemia - reperfusão (IR), 3. RC-3095 anterior a IR (RC-Pré), 4. RC-3095 posterior a IR (RC-Pós).

O modelo foi desenhado com uma previsão inicial de 24 animais, conforme determinado pelo cálculo amostral.

4. 5. Eutanásia e coleta de amostras de sangue para análise funcional

Procedeu-se a eutanásia dos animais por meio de incisão da artéria aorta abdominal, com retirada subsequente do bloco pulmonar (primeiro retiramos o pulmão esquerdo, depois o direito para controle). A coleta de gases arteriais foi realizada por aspiração de 0,1 mL de sangue arterial via punção da carótida. A análise dos gases arteriais foi realizada 15 minutos após a instalação da ventilação mecânica, ao término do período isquêmico e ao final do tempo de 120 minutos.

4. 6. Amostras de tecido para histologia do pulmão

As amostras para a análise histológica foram preparadas na Unidade de Pesquisa de Patologia no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram obtidas amostras de tecido pulmonar do pulmão esquerdo e direito dos animais. Estas amostras foram obtidas do lobo superior e fixadas em formalina 10% por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram seccionadas horizontalmente em fatias de 1 cm. O tecido foi emblocado em parafina e efetuados cortes de 5 micra, corados pela técnica de hematoxilina – eosina.

4. 7. Preparação dos extratos e quantificação de proteínas

O órgão foi homogeneizado em Ultra-Turrax durante um minuto à temperatura de 4°C (Celsius) e a seguir centrifugado por 10 minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada. Amostras de tecido do pulmão direito e esquerdo foram seccionadas, pesadas e mantidas a -80 °C. Brevemente, amostras do lobo inferior esquerdo do pulmão foram separadas e incubadas com Triton X-100 - 10% por 30 minutos em gelo (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; aprotinina 10µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, PMSF 2 mM). Imediatamente, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos, e os sobrenadantes submetidos à quantificação protéica através do método de Bradford e utilizando uma curva padrão de 50 a 1000 µg/mL de albumina

bovina sérica e reagente de Bradford⁸⁷ (*coomassie brilliant blue* 0,01%, etanol 47%, ácido fosfórico 8,5% e água destilada q.s.p); a absorvância foi determinada a 595nm. A leitura da densidade óptica foi determinada através do leitor de ELISA (Power Wave; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 15 pg/ml. O protocolo de ELISA foi realizado com o kit Duo-set (BD Bioscience Inc., MA, USA) e as amostras com o homogenato de proteínas permaneceram incubadas em gelo durante todo o processo e brevemente foram analisadas.

4. 8. Expressão de citocinas por ELISA

A análise da expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α foi realizada pelo método de ELISA com anticorpo específico para cada citocina. - Kits Duo-set disponíveis para IL-1 β (*BD Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA*) e TNF- α (*Pharmingen, San Jose, CA, EUA*). Incubou-se a placa, de um dia para o outro a 4°C com o anticorpo primário (captura 100 μ L/poço). Após esse período, a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20 - *Sigma Chemical Co, EUA*) e incubada com o tampão de experimento que contém PBS e BSA por 1 hora. Após nova lavagem, foram adicionadas as amostras /ou padrão (curva) e incubou-se por mais 2 horas. Ao final desse período, foram adicionados os anticorpos secundários biotinizados (100 μ L/poço) e incubados por mais 2 horas. A placa foi novamente lavada e adicionada 100 μ L/poço de estreptovidina conjugada com HRP (*Horseradish Peroxidase*). A placa foi coberta e protegida da luz e incubada por mais 20 minutos. Em sequencia, a placa foi novamente lavada e incubada a 37°C por mais 30 minutos com 100 μ L/poço de TMB (*tetramethylbenzidine* - *Calbiochem,USA*) e protegida da luz. A reação colorimétrica foi interrompida com H₂SO₄ (2N) utilizando um filtro de 450 nm. Os resultados foram normalizados pela proteína total do tecido pulmonar com sensibilidade de 15 pg/ml quantificada previamente pelo método de Bradford⁸⁷ A metodologia encontra-se no anexo 1 e 2.

4. 9. Expressão proteica por imunohistoquímica - atividade da eNOS e Caspase clivada - 9

A análise da atividade da eNOS e Caspase-9 foi realizada pelo método de imunohistoquímica específico para cada anticorpo específico disponível para cada detecção. Secções de tecido do pulmão esquerdo e direito dos animais foram fixados em formol e emblocados em parafina em cortes de 3 µm para a preparação das lâminas. Após 40 minutos em estufa à 80°C passaram pelo processo de desparafinização, hidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e receberam proteína bloqueadora REF DPB-125 por 10 minutos e tampão PBS por 5 minutos. As mesmas foram incubadas em temperatura ambiente durante 2 horas com um anticorpo primário alvo específico.

Enzima sintase do óxido nítrico (eNOS)

Foi utilizado o anticorpo NOS3 (H-159): 8311, Santa Cruz, diluído 1:100 em PBS. Imediatamente as lâminas foram enxaguadas durante 15 minutos com PBS e incubadas em temperatura ambiente durante uma hora com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (HRP; DGS -125, BIOGEN) em uma concentração de 1:200. As lâminas foram novamente enxaguadas com PBS durante 15 minutos, e logo depois utilizado DAB líquido (BGSPB-999, BIOGEN) como substrato para a visualização dos alvos no tecido. Após a reação com DAB para obter um melhor contraste as lâminas foram coradas com hematoxilina, que resultou num precipitado de cor marrom-castanho no local de antígeno.

Caspase clivada - 9

Foi utilizado o anticorpo *Cleaved Caspase-9 (Asp353)*, *Cell Signaling*, diluído 1:100 em PBS. Logo após, as lâminas foram enxaguadas durante 15 minutos com PBS e incubadas em temperatura ambiente durante uma hora com um anticorpo secundário multi espécie conjugado com peroxidase (HRP; DGS -

125, BIOGEN) em uma concentração de 1:200. As lâminas foram novamente enxaguadas com PBS durante 15 minutos, e logo depois utilizado DAB líquido (BGSPB-999, BIOGEN) como substrato para a visualização dos alvos no tecido. Após a reação com DAB para obter um melhor contraste as lâminas foram coradas com hematoxilina.

4. 10. Variáveis estudadas

- Variáveis hemodinâmicas: Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial de Oxigênio (PO₂) e Pressão Parcial de Gás Carbônico (PCO₂). Os parâmetros de PAM, PO₂ e PCO₂ foram observados em três tempos e denominados:

Baseline – após instalação da ventilação mecânica

t₂ - término do período isquêmico

Final – término do tempo de reperfusão.

- Lesão pulmonar

A análise histopatológica quantitativa foi realizada por dois patologistas cegos ao protocolo do experimento e da região da amostra. Cada amostra foi analisada sobre campo de baixo e alto poder e as alterações inflamatórias, intensidade e localização das lesões histopatológicas foram avaliadas usando o escore (HIS) baseado em seis parâmetros, segundo Fujino Y. *et al*, 2000⁸⁸.

A – edema intra-alveolar, (edema septal, intersticial, linfangiectasias, exsudado intra-alveolar);

B – formação de membrana hialina;

C – hemorragia alveolar;

D - recrutamento de granulócitos para dentro de espaços aéreos, neutrófilos em espaços aéreos, infiltrado neutrocitário perivascular;

E – colapso alveolar focal ou consolidação;

F – descamação epitelial/necrose de via aérea ou alvéolo; ruptura de septos.

Cada parâmetro foi avaliado semi quantitativamente quanto à intensidade da lesão usando a seguinte escala: grau 0= ausente, grau 1= leve, grau 2= moderado, grau 3= acentuado.

Escore	Observação Microscópica
0	zero
1	1 - 30% alvéolos
2	31 - 60 %
3	61 - 100%

Além disso, a percentagem de área envolvida de cada amostra de tecido foi estimada (0 -100%) para quantificar as mudanças histológicas. Para cada amostra foi calculado um escore balanceado (WIS) através do produto de HIS com a percentagem de área envolvida conforme *Fujino Y. et al*, 2000.

- Expressão da enzima sintase do óxido nítrico (eNOS)

Os parâmetros das observações de captação de eNOs nas células do endotélio, pneumócitos, estroma, macrófago e neutrófilo foram marcados quanto à localização, intensidade de distribuição e tipo de distribuição. A planilha com a graduação conforme o critério estabelecido encontra-se em anexo e segue abaixo os parâmetros com as siglas utilizadas.

Localização: citoplasma (C), membrana (M) ou núcleo (N);

Intensidade: forte (F) ou fraca (f);

Distribuição; focal (F) ou difusa (D).

- Expressão de Caspase clivada – 9

A expressão da caspase 9 foi estudada a fim de avaliar o envolvimento do RC-3095 através da via apoptótica. A análise dos tecidos foi realizada por patologista do HCPA cego ao protocolo experimental que avaliou a captação de caspase clivada - 9 por células do endotélio, pneumócitos, estroma, macrófago, neutrófilo, células brônquicas e linfócitos foram marcados seguindo os parâmetros: localização (citoplasma, membrana e núcleo), intensidade (forte ou fraca) e quanto ao tipo de distribuição (focal ou difusa). A tabela com a marcação das lâminas encontra-se em anexo.

4. 11. Considerações Éticas

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, conforme consta na Resolução do Projeto número 11-0609. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a legislação vigente, em especial a Lei 11.794/08, conforme as recomendações de cuidados da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GOLDIM, 1997), bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS) e com o *Guide for the care and use of laboratory animals* e as recomendações de cuidado⁸⁹.

4. 12. Análise Estatística

Os dados coletados foram armazenados em planilha eletrônica (Microsoft Excel® 6.0). A análise estatística foi realizada por programa estatístico SPSS 17.0 (*Statistical Package for Social Science*). Para analisar as amostras independentes foi utilizado o teste não paramétrico do qui – quadrado, seguido pelo teste de *Kruskal – Wallis* para a comparação dos grupos. Os valores obtidos foram descritos através de medianas e intervalo interquartilico.

As medidas hemodinâmicas estudadas, de mecânica respiratória e de troca gasosa, avaliada pela análise de gases arteriais foram medidas em diferentes tempos e analisadas através do teste Friedman e da análise estatística *Generalized Estimating Equation* (GEE) que é similar a ANOVA para medidas repetidas. Os resultados foram representados em tabelas por mediana e intervalo interquartilício.

A severidade das lesões histológicas foi analisada usando o escore (HIS) e foram descritas na forma de frequência absoluta. O teste exato de Fisher foi utilizado para análise comparativa entre os grupos. A avaliação estatística foi apresentada graficamente com as medianas dos grupos e intervalo interquartilício (inferior-superior). O cálculo do escore balanceado (WIS) foi obtido através do produto de HIS com a percentagem de área envolvida. As mudanças histológicas de HIS e WIS foram representadas graficamente por frequências relativas.

4. 13. Cálculo do tamanho da amostra

O estudo foi delineado com cálculo de tamanho amostral com um intervalo de confiança de 95% a fim de detectar nas variáveis estudadas uma diferença maior que 30 % entre os grupos intervenção e controle. Levando-se em consideração um erro tipo I de 0,05 e um erro tipo II de 0,5, o resultado apontou para uma amostra de seis animais por grupo. Prevendo as possíveis perdas que poderiam ocorrer durante o experimento, foi adicionado a este cálculo uma margem de 10%, totalizando 28 animais.

5. Resultados

O modelo foi desenhado com uma previsão inicial de 24 animais, conforme determinado pelo cálculo amostral. A este número foi adicionado uma margem de 15%, prevendo possíveis perdas durante o experimento, totalizando 28 animais.

Foram considerados incompletos os animais que não obtiveram todas as medidas necessárias, seja por falha do equipamento durante o estudo, seja por não completar o tempo de observação previamente estabelecido. Finalizamos o estudo com 20 animais com todos os dados completos para a análise dos resultados, conforme ilustração abaixo (Fig.2). O experimento iniciou em agosto de 2013 e terminou em março de 2014.

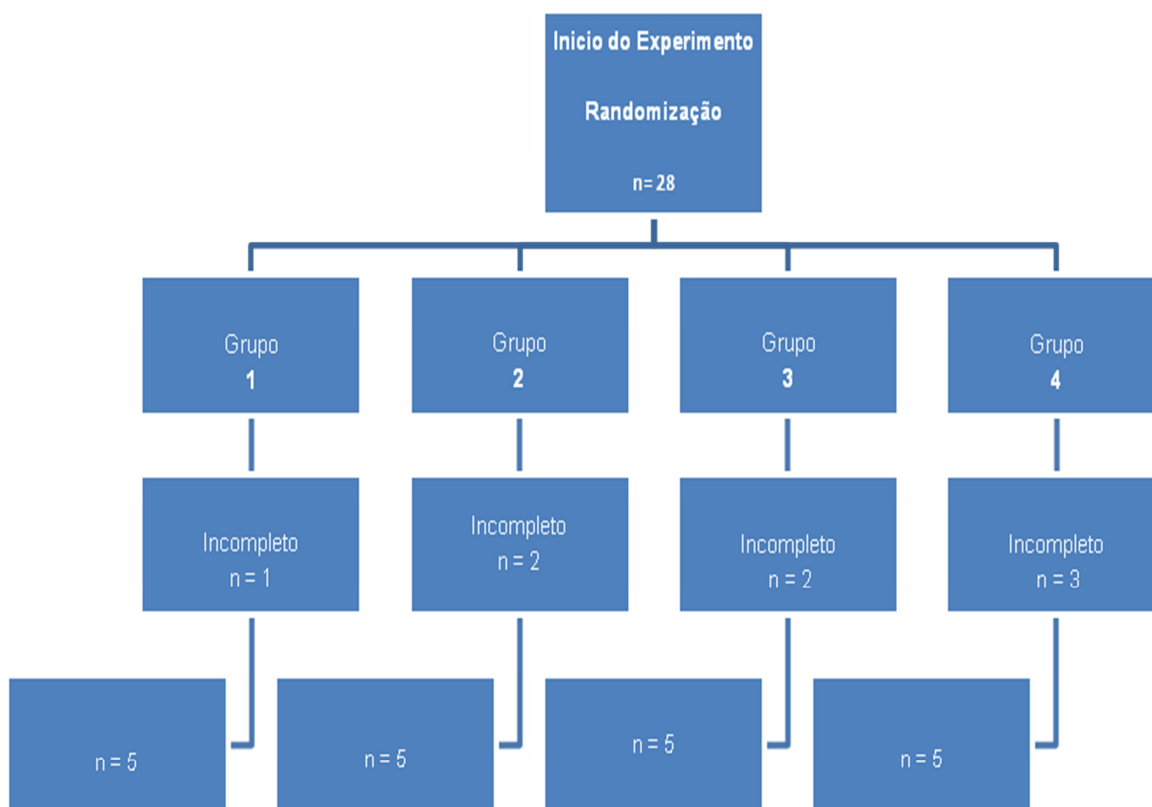


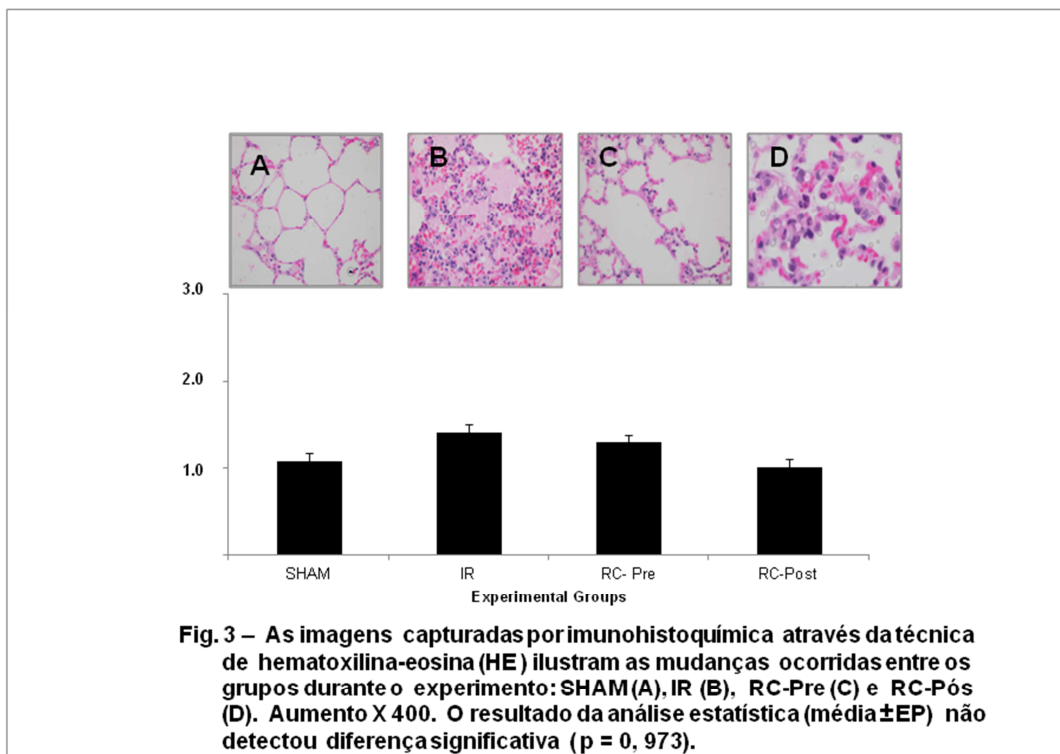
Fig. 2 - Modelo esquematizado com fluxo de entrada dos animais com a previsão inicial da amostra, os animais excluídos e o número final de animais estudados.

5.1. Atividade funcional dos pulmões

O desempenho funcional dos pulmões foi avaliado por gasometria utilizando a análise estatística GEE para medidas repetidas. Houve redução significativa na PaO₂ dos grupos IR, e RC pré e pós-IR quando comparado com seus valores antes da reperfusão ($p=0,02$). O grupo que recebeu RC pós-IR apresentou uma redução significativa na PaO₂ quando comparado com todos os outros grupos ($p = 0,04$). Dados do desempenho funcional com as variáveis hemodinâmicas encontram-se em anexo (Tabela1).

5.2. Lesão Pulmonar

A avaliação da influência da medicação em estudo sobre a lesão foi realizada conforme os parâmetros: edema, inflamação intersticial e alveolar, hemorragia alveolar, colapso e necrose. Apesar de não haver diferença estatística entre valores médios dos grupos ($p = 0,973$), observam-se discretas diminuições nos escores encontrados em lobo superior esquerdo dos animais dos grupos RC pré e pós-IR comparando ao grupo IR (Fig.3).



5.3. Expressão de citocinas inflamatórias

As amostras do lobo superior inferior esquerdo foram analisadas cegadamente pelo método de ELISA através da quantificação das interleucinas- 1 beta (IL-1 β) e Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- α) para avaliar o envolvimento do RC-3095 sob a via inflamatória. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos nos níveis de IL-1 β (p = 0.159) e TNF- α (p= 0.260). No entanto, observam-se interessantes diminuições nos níveis de TNF- α com quantificações menores no grupo RC-Pós que RC-Pré. Diminuição mais expressiva observa-se nas quantificações da IL-1 β no grupo RC-Pré quando comparadas as encontradas nos grupos RC-Pós e IR (Fig 6, 7). A metodologia utilizada encontra-se em anexo.

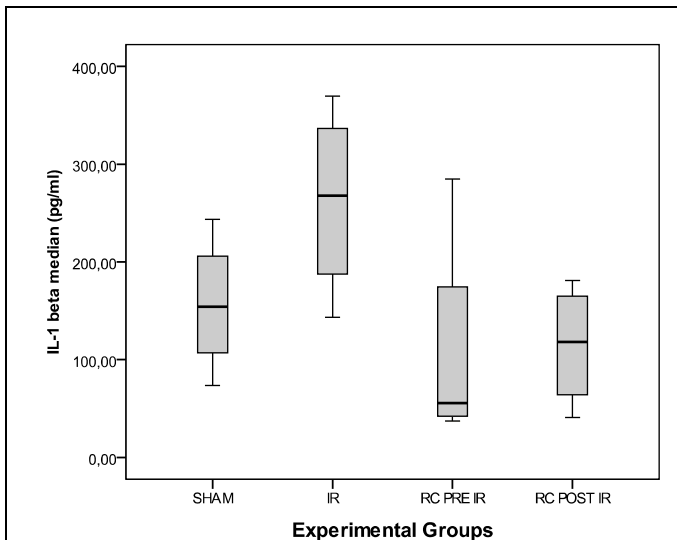


Fig. 4 - Expressões de IL-1 β comparativa entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa. $p = 0.159$ (mediana \pm EP).

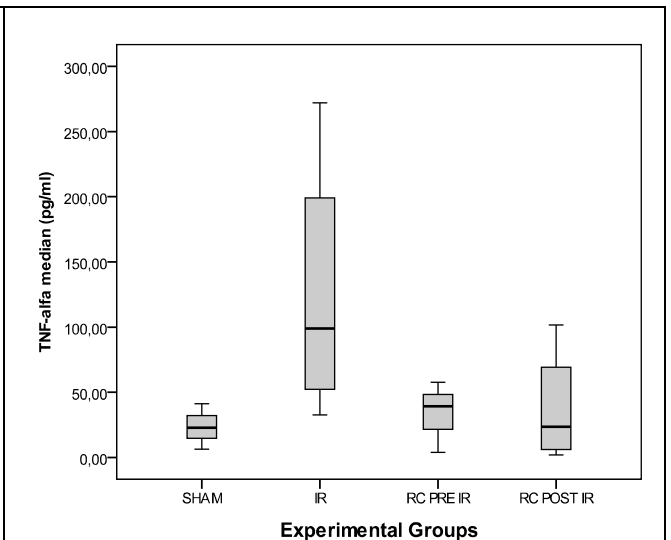


Fig. 5 - Expressões de TNF- α conforme análise comparativa entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa $p = 0.260$ (mediana \pm EP).

5.4. Expressão da Caspase clivada - 9

Observa-se mínima expressão de caspase clivada - 9 no núcleo de pneumócitos dos animais dos grupos IR e RC-Pré, no entanto uma diferença significativa ($p=0,013$) no grupo RC-Pós, tanto no lobo superior esquerdo como no direito associado a alta captação de caspase em relação aos outros grupos.

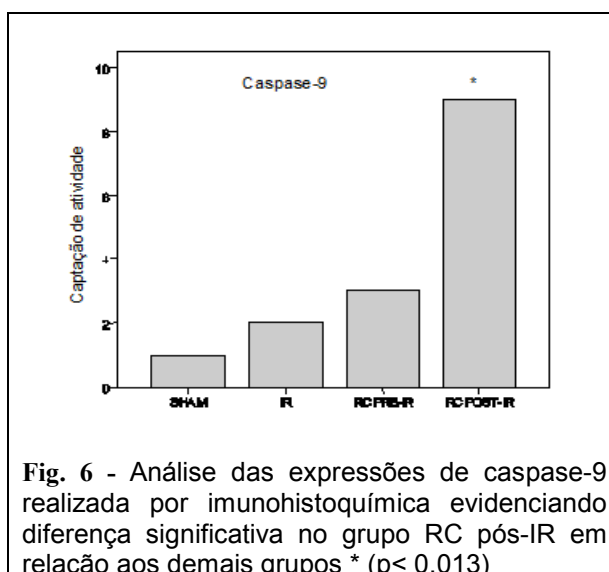


Fig. 6 - Análise das expressões de caspase-9 realizada por imunohistoquímica evidenciando diferença significativa no grupo RC pós-IR em relação aos demais grupos * ($p < 0,013$)

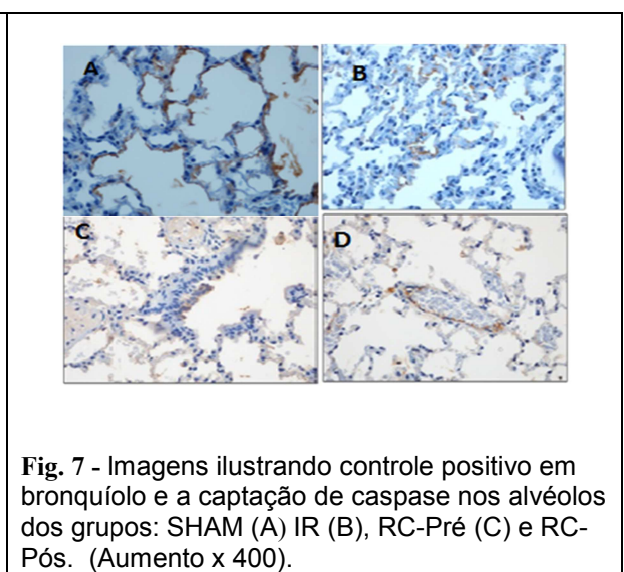


Fig. 7 - Imagens ilustrando controle positivo em bronquíolo e a captação de caspase nos alvéolos dos grupos: SHAM (A) IR (B), RC-Pré (C) e RC-Pós. (Aumento x 400).

5.5. Expressão da eNOS)

Observa-se forte expressão da eNOS no citoplasma do endotélio tanto do lobo superior direito como do esquerdo em todos os grupos de forma que não foram encontradas evidências que o RC-3095 possa interferir na ação imunorregulatória de eNOS. Entretanto, uma frequência de distribuição com padrão mais focal foi encontrada nos grupos onde houve a intervenção com RC Pré e Pós quando comparado a padrão mais difuso dos grupos controle IR e SHAM ($p=0,206$ [0,196 – 0,216]).

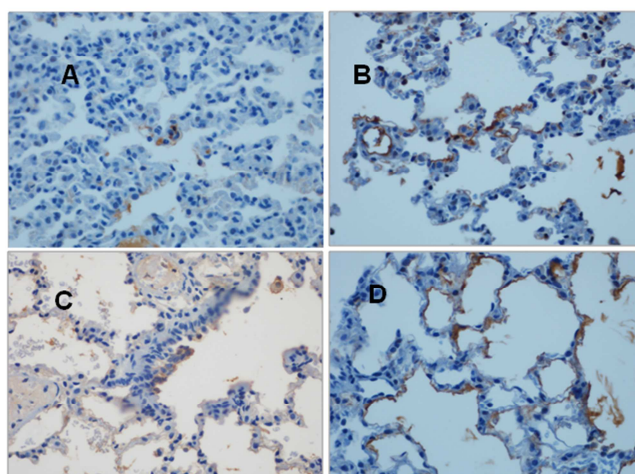


Fig. 8 – Imagens da captação da eNOS ilustrada pela coloração marrom através da técnica de imunohistoquímica. A análise estatística não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0.206$). SHAM (A), IR (B), RC-Pré (C) e RC-Pós (D) . (Aumento $\times 400$)

6. ARTIGO CIENTÍFICO – Submitted BioMed Research International

TITLE PAGE

RC-3095, a selective gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) antagonist does not protect the lungs in an experimental model of lung ischemia-reperfusion injury (LIRI)

Vera L. Oliveira-Freitas – MSc, Federal University of Rio Grande do Sul – Department of Research Group and Post-Graduation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, room 21313 , 90.035-903. E-mail: vlfreitas@hcpa.ufrgs.br

Leonardo Dalla Giacomassa Rocha Thomaz - Lung and Airway Laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, room 21313, 90.035-903. E-mail: leorochat@gmail.com

Lucas Elias Lise Simoneti – Lung and Airway Laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, room 21313 - CEP. 90.035-903. E-mail: lucaslise@hotmail.com

Christiane Malfitano - Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho, Rua Vergueiro, 235/249 - 3 subsolo, Bairro Liberdade - São Paulo-SP, 01.504-000. E-mail: chrismalfi@hotmail.com

Kátia De Angelis - Laboratory of Translational Physiology, Universidade Nove de Julho, Rua Vergueiro, 235/249 - 3 subsolo, Bairro Liberdade - São Paulo-SP, 01.504-000. E-mail: kangelis@uninove.br

Jane Maria Ulbrich – MD, PhD, Department of Pathology Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ramiro Barcelos, 2350/ 90.035-903. E-mail: jmaria@gmail.com

Gilberto Schwartzmann – MD, PhD, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 3º Leste. CEP. 90.035-903. E-mail: gilberto.ez@terra.com.br

Cristiano Feijó de Andrade – MD, PhD, Department of Thoracic Surgery Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA and Hospital da Criança Santo Antônio. Ramiro Barcelos, 2.350 / 90035-903. Porto Alegre – RS Brazil. E-mail: cristianofa@gmail.com

*Corresponding author: Cristiano Feijó Andrade

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Thoracic Surgery Department
Ramiro Barcelos, 2.350 / 90035-903 Porto Alegre – RS Brasil
Phone: (55 51) 3359-8684 Fax: (55 51)3359-8884
cristianofa@gmail.com

ABSTRACT

RC-3095, a selective GRPR antagonist, has been shown to have anti-inflammatory properties in different models of inflammation, however its protective effect on lungs submitted to lung ischemia reperfusion injury has not been addressed before. Then, we administrated RC-3095 intravenously before and after lung reperfusion using an animal model of lung ischemia-reperfusion injury (LIRI). Twenty Wistar rats were randomized in four groups: SHAM, Ischemia-reperfusion (IR), RC-Pre and the RC-Post IR. The final mean arterial pressure significantly decreased in IR and RC-Pre compared to their values before reperfusion ($P<0.001$). The RC-Post group showed significant decrease of partial pressure of arterial oxygen at the end of the observation when compared to baseline ($P=0.005$). Caspase-9 activity was significantly higher in the RC-Post as compared to the other groups ($P<0.013$). No significant differences were observed of eNOS activity among the groups. The groups RC-Pre e RC-Post did not show any significant decrease of IL-1 β ($P=0.159$) and TNF- α ($P=0.260$), as compared to IR. The histological score showed no significant differences among the groups. In conclusion, RC3095 does not demonstrate a protective effect in our LIRI model. Additionally, its use after reperfusion seems to potentiate cell damage, stimulating apoptosis.

Keywords – Ischemia; Reperfusion; Apoptosis; anti-inflammatory response; lung injury; gastrin-releasing peptide receptor antagonist

Introduction

Lung ischemia reperfusion injury (LIRI) is the main cause of early graft dysfunction and death after lung transplantation (2). Pulmonary edema constitutes its most frequent clinical manifestation, which is triggered by an excessive release of proinflammatory mediators, reactive oxygen species (ROS), cytokines, and neutrophil infiltration in the lungs (3-5). Ischemia causes an imbalance between metabolic supply and demand, leading to tissue hypoxia, cellular damage, and death (6).

Several methods and substances have been used as an attempt to protect the lungs during the early phase of post-transplantation and to improve short- and long-term graft performance; however, these efforts have generated limited results (7, 8). The techniques include lung protective ventilation (9, 10), appropriate fluid management, the optimization of organ preservation in lung transplantation and the minimization of ventilation and anoxic ischemic time (11).

The gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuropeptide that acts through G protein-coupled receptors (12). It participates in signal transmission in both the central and peripheral nervous systems (12, 13). Its preferred receptor, gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), is expressed by various cell types, including those of the gastric, respiratory, and nervous systems, and it is overexpressed in tumor cells (13). Recent studies have demonstrated the relationship between GRPR signaling and inflammation (14). GRPR is involved in the induction of innate and adaptive immune responses by inducing mast cell chemotaxis, macrophage migration, and T cell and fibroblast proliferation (15).

RC-3095, a selective GRPR antagonist, has been shown to have anti-inflammatory properties in murine models of arthritis, gastritis, uveitis, and sepsis by attenuating the release of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1-beta (IL-1 β), and the activation and migration of mononuclear cells to sites of inflammation (16). In addition, GRP mediates air pollution-induced airway hyperreactivity and inflammation in rodents (14).

Because GRPR signaling has been shown to be a relevant component of the inflammatory response in various experimental models and the excessive

release of proinflammatory mediators and cytokines, as well as neutrophil infiltration in the lung, is a central event for the development of LIRI, we hypothesized that the GRPR antagonist, RC-3095, imparts a protective effect on LIRI.

Materials and Methods

The animals were handled in accordance with the Animal Welfare Act and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication, revised 1996). The Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the experimental protocols.

Experimental protocol

Twenty Wistar male rats with a mean weight of 360 g were randomly assigned to one of four treatment groups (n = 5): Simulation of surgery (SHAM), Ischemia-reperfusion (IR), RC-Pre (RC-3095 Pre-LIRI), and RC-Post (RC Post-LIRI). RC-3095 was administered as a single dose to the left jugular vein 15 min before the induction of ischemia (RC Pre-IR group) and immediately after clamp removal (RC Post-IR group). All animals were observed for 120 min after reperfusion. RC-3095 (0.3 mg/1 mL) was diluted in normal saline, following the protocol described in previous studies conducted by our research group (14).

The animals were subjected to induction anesthesia with 0.5 L/min of oxygen flow and isoflurane (100 mL/min). Rats were systemically heparinized (1 mg/kg) parenterally and underwent cervical tracheostomy with a plastic cannula (Abbocath® n° 14; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Anesthesia was then maintained using 0.2 L/min of oxygen flow and isoflurane (10 mL/min). The animals were mechanically ventilated with room air (Harvard Rodent Ventilator, Model 683; Harvard Apparatus Co., Millis, MA, USA) using a tidal volume of 8 mL/kg body weight, a respiratory rate of 70–80 breaths/min, and a positive end-expiratory pressure of 2 cm H₂O.

The mean arterial pressure (MAP) was measured through cannulation of the right carotid artery (Sirecust 730, Siemens, Solna, Sweden), which was also

used for collecting samples for arterial blood gas analysis (Blood Gas Analyzer, Siemens Bayer 865; Siemens).

Left thoracotomy was performed in the fifth intercostal space, the pulmonary ligament was sectioned, and subsequently, the left pulmonary hilum was clamped (Vicca Neuroclip, Cachoeirinha, RS, Brasil). Immediately before clamping, lung expansion was achieved through occlusion of the expiratory valve for three inspiratory cycles to prevent alveolar collapse and consolidation. During the clamping period, both lungs were maintained on mechanical ventilation using the settings previously described (17)

MAP and arterial blood gases were measured before thoracotomy (baseline), after ischemia (predetermined 45-min), and at the end of the experiment. After the 120-min reperfusion period, the animals were sacrificed by incision of the abdominal aorta. Hemodynamic, gas exchange, and pulmonary mechanics were measured at baseline, after lung injury, and after 120 min of observation.

Measurement of cytokine levels

Tissues of the right and left lungs were sectioned, weighed, and stored at -80°C. Homogenates were prepared by incubating the tissues in a tissue lysis buffer containing 10% Triton X-100 dissolved in a solution consisting of 100 mM Tris (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, and 2 mM PMSF, for 30 min on ice. Immediately after incubation, the samples were centrifuged at 13,000 rpm, 4°C for 20 min. The supernatants were submitted for protein quantification by the Bradford method, using a standard curve from 50–1,000 µg/ml of bovine serum albumin and the Bradford reagent (0.01% Coomassie brilliant blue, 47% ethanol, 8.5% phosphoric acid, and distilled water q.s.p); the absorbance was determined at a wavelength of 595 nm.

Protein quantification and expression analysis of IL-1 β and TNF- α were performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method that was specific for each cytokine. The ELISA protocol was performed with the Duo-set (BD Bioscience Inc., MA, USA).

Immunohistochemical studies

Caspase-9 and eNOS activity were performed on serial sections prepared from paraffin-embedded, formalin-fixed rat lungs. After paraffin removal using xylene, the sections were rehydrated and subjected to a 40-min to heat treatment at 80°C. The specimens were incubated in a peroxidase Block reagent (BIOGEN) to quench endogenous peroxidase activity and any nonspecific reactions were blocked for 10 min.

The sections were then incubated with primary antibodies specific for caspase-9 and eNOS (Asp353, Cell Signaling) and (H-159-Santa Cruz), respectively, at a dilution of 1:100, for 2 h at room temperature, followed by incubation with the labeled polymer for 30 min. Staining was performed by incubating the sections with diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate chromogen, (DAB-BIOGEN), which resulted in a brown-colored precipitate at the antigen site. The sections were then counterstained with hematoxylin for visualization.

Immunohistochemical staining was scored according to the distribution of expression of the target proteins in the evaluated areas, namely, the nucleus, membrane, or cytoplasm. In addition, the intensity of immunostaining was described as follows: 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = strong. A semi-quantitative approach was used to measure the areas and the intensity of staining of the tissues. A pathologist who was blinded to the clinical and histopathologic information independently analyzed the slides. Caspase-9 and eNOS activity was assed using a cellSens Digital Imaging Software (DP77 microscopy camera, BX41 Microscopy, Olympus).

Histologic Analysis

Sample preparation. The sections of the right and left lungs were excised and then immersed in 10% formalin for 60 h. After fixation, the lungs were separated at the hilum, and each lung was sectioned horizontally (right and left lung). The tissue blocks were cut from each region and embedded in paraffin wax, from which 5-mm sections were prepared, mounted, and stained with hematoxylin-eosin.

Two pathologists who were blinded to the experimental protocol, the test groups, and the region of sampling performed the quantitative examination by

light microscopy. Each sample was examined under both low and high power fields, and 20 fields from each section were analyzed by one of the pathologists. The other pathologist randomly selected and analyzed those 20 fields from each sample.

The severity of histologic lesions was assessed using a score (HIS) that was based on six parameters: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, recruitment of granulocytes into the air space, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation/necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semi-quantitatively using the following scale: 0 = absent, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = prominent. In addition, the percentage of the involved area of each histologic specimen was estimated (0 to 100%) to quantify any observed histologic changes (18).

For each sample, a weighted histologic score (WIS) was computed from the product of HIS and the percentage of area involved. The HIS and WIS scores of the dependent and non-dependent lung regions of each animal were calculated.

Statistical Analysis

The results presented in the text, tables, and figures were expressed as the median \pm interquartile range. The data were analyzed using the SPSS version 16.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Nonparametric Kruskal-Wallis test was performed, followed by chi-squared test for intergroup comparisons. A *P* value of <0.005 was considered significant.

Results

The final mean arterial pressure significantly decreased in the IR and RC Pre-IR groups compared to the baseline ($P < 0.001$). The RC Post-IR group showed a significant decrease in the partial pressure of arterial oxygen at the end of the observation period compared to the baseline ($P = 0.005$) (Table 1).

No differences in the levels of IL-1 β ($P = 0.159$) and TNF- α ($P = 0.260$) were observed in the RC-Pre and RC-Post groups, compared to the IR group (Fig. 1).

No significant differences in histological scores were observed among the study groups. The RC-Post group showed a slight reduction in the histological scores compared to that of the other groups (Fig. 2)

The caspase-9 activity of pneumocytes was significantly higher in the RC Pos-IR group, compared to the other groups ($P < 0.013$) (Fig. 3 and 4). No significant differences in eNOS activity were observed among the groups

Discussion

Several studies using both animals and humans have investigated the effects of pharmacologic interventions in reducing the release of proinflammatory cytokines and chemokines, as well as other events that are potentially related to the development LIRI; however, these efforts have generated unclear results (7, 17, 19, 20)

A rodent model for LIRI was selected for the present study because this has been extensively used in the previous reports (17, 21). This animal model mimics several features of LIRI such as the inflammatory changes and structural damage to the lungs (20, 21). Furthermore, the differences in mean arterial pressure prior to and after reperfusion among the groups were similar compared to those described in the literature (20).

Only the RC Post-IR group showed a significant decrease in the mean measurements of partial pressure of arterial oxygen at the end of the observation, as compared to the baseline. These results indicate that RC, when administered after reperfusion, potentiates the harmful effects of the IR process. Although, the present study did not show a clear protective effect of RC on the lung ischemia reperfusion injury model, we observed a trend in reduction of IL-1 β in the RC-Pre group, compared to that in the IR group. This effect of RC reduction of inflammatory mediators has been demonstrated in various conditions such as arthritis, colitis, and sepsis (22-24). Unfortunately, information on the level of GRPR expression in the tissues and the GRP levels in plasma was not available for inclusion in the analysis of the present study. This information might have assisted in the interpretation of our results. It is also possible that the basic mechanisms involved in the pathogenesis of LIRI differ from those of other inflammatory conditions whose GPRR signaling could be more relevant (22-24). Additionally, there are also species-specific pharmacological effects that could sometimes lead to discrepancies between laboratory observations and the findings obtained from patients with LIRI in the clinical setting (2-5, 11).

RC-3095 was administered to animals as a single dose before the induction of ischemia and immediately after clamp removal. This treatment schedule and doses were comparable to those applied by our group in previous studies performed in rodent models (22, 23). Thus, we could argue that the experimental conditions were adequate for the evaluation of the protective effects of the GRPR antagonist, particularly in terms of dose intensity.

Although GRPR inhibition did not impart a protective effect on our LIRI model, caspase-9 activity in pneumocytes was significantly higher in the animals that received RC-3095 Pos-IR, compared to the other groups. Active caspase-9 cleaves and activates caspase-3, thereby inducing events that lead to DNA fragmentation and cell death. This occurs as early as 15 min after treatment. Thus, once caspase-9 is activated, a protease cascade is initiated, which in turn leads to the rapid activation of caspase-3 and apoptosis (25). Based on these findings, we hypothesize that in the presence of RC-3095, caspase-9 was upregulated in the RC-Post group, which activated caspase-3 and resulted in apoptosis as a response mechanism to tissue injury. Interestingly, the RC-Pre group did not show these alterations, suggesting that its administration prior to reperfusion might have a beneficial effect or at least did not induce an increase in caspase-9 activity. Additionally, in a previous study conducted by our group, we observed an increase in the activity of caspase-3 after 45 min of ischemia, which was associated with a higher number of apoptotic cells (21).

eNOS activity mainly observed in the cytoplasm of the endothelial layer of the lung tissue, with a similar distribution among all groups. This finding therefore demonstrates that this enzyme does not have any function in LIRI (26).

In conclusion, the administration of RC3095, which is a selective GRPR, after reperfusion is harmful to IR lungs, as indicated by the induction of apoptosis and the decrease in PaO₂; however, no signs of lung damage were evident during lung histological analysis. The use of RC prior to reperfusion as a protective substance against IR therefore requires further studies to establish the mechanism of GRPR modulation in LIRI.

Acknowledgments

This research was supported by grants from FIPE/HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre Institutional Research Fund). The authors are especially grateful to the PGCM/UFRGS (Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas–Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Brazil, for all the help and cooperation that they have extended to our research group.

References

- [1] den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H1283-99.
- [2] Goudarzi BM, Bonvino S. Critical care issues in lung and heart transplantation. *Crit Care Clin* 2003;19:209-31.
- [3] Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:261-72.
- [4] Varela de Ugarte A. [Primary graft failure following lung transplantation: is there hope for improvement?]. *Arch Bronconeumol* 2005;41:473-4.
- [5] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17:1391-401.
- [6] Forgiarini Junior LA, Holand AR, Forgiarini LF, da Rosa DP, Marroni NA, Cardoso PF, et al. Endobronchial perfluorocarbon reduces inflammatory activity before and after lung transplantation in an animal experimental model. *Mediators Inflamm* 2013;2013:193484.
- [7] Erne BV, Jungraithmayr W, Buschmann J, Arni S, Weder W, Inci I. Effect of N-Acetylcysteine on Acute Allograft Rejection After Rat Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg* 2013:1021-7.
- [8] Madke GR, Forgiarini LA, Grün G, Fontena E, Pereira RB, de Moraes MM, et al. Effect of positive end-expiratory pressure after porcine unilateral left lung transplant. *Exp Clin Transplant* 2013;11:50-5.
- [9] Felix EA, Andrade CF, Cardoso PF, Thiesen GC, Antonio AC, Martins LK, et al. Ventilation strategy and its influence on the functional performance of lung grafts in an experimental model of single lung transplantation using non-heart-beating donors. *J Bras Pneumol* 2010;36:554-61.
- [10] Todd JL, Christie JD, Palmer SM. Update in lung transplantation 2013. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:19-24.
- [11] Gruber CW, Muttenthaler M, Freissmuth M. Ligand-based peptide design and combinatorial peptide libraries to target G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 2010;16:3071-88.
- [12] Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197-204.

- [13] Petronilho F, Danielski LG, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide as a molecular target for inflammatory diseases: an update. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12:172-7.
- [14] Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:2100-5.
- [15] Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, Abujamra AL, Pinto LG, et al. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 109; 2012:pp. 547-52.
- [16] Forgiarini LF, Forgiarini LA, da Rosa DP, Silva MB, Mariano R, Paludo AD, et al. N-Acetylcysteine administration confers lung protection in different phases of lung ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [18] Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:650-7.
- [19] Torres RL, Martins LK, Picoral M, Auzani J, Fernandes TR, Torres IL, et al. The potential protective effect of low potassium dextran against lipid peroxidation in a rat lung transplantation model. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009;57:309-11.
- [20] Forgiarini LA, Jr., Forgiarini LF, da Rosa DP, Mariano R, Ulbrich JM, Andrade CF. Endobronchial perfluorocarbon administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2013;183:835-40.
- [21] Forgiarini LA, Jr., Grun G, Kretzmann NA, de Munoz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? *J Surg Res* 2013;179:168-74.
- [22] Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JC, Roesler R, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2956-65.
- [23] Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84-90.
- [24] Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, et al. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2010;55:2203-10.
- [25] Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol* 2008;26:493-500.
- [26] Dias-Junior CA, Cau SB, Tanus-Santos JE. [Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications]. *J Bras Pneumol* 2008;34:412-9.

TABLE 1 - Hemodynamic variables and gas exchange. Comparative analysis of the groups regarding the time during all experimental protocol

	MAP			<i>P</i>	PaO ₂			<i>P</i>	PaCO ₂			<i>P</i>
	Baseline	t ₂	Final		Baseline	t ₂	Final		Baseline	t ₂	Final	
SHAM	94 [90; 140]	90 [75; 103]	86 [73.5; 90]	0.165	342.2 [265.2; 353.9]	278.6 [231.4; 300.5]	300.6 [255.95; 378.15]	0.368	47.4 [44.6; 49.9]	44.9 [43.7; 48.9]	47.5 [45.45; 50.8]	0.779
IR	110* [96; 151]	81 [73; 90]	65** [64; 75]	0.007	187.1 [148.6; 318.4]	228.1 [171.9; 348]	149.1 [147.4; 161.2]	0.449	35.9 [32.5; 44.9]	39.9 [34.1; 44.4]	20.7 [20.5; 49.7]	0.819
RC-PRE	93* [85.5; 125]	67.5 [62; 73]	46** [45; 53]	0.015	282.3 [251.2; 341.7]	223.7 [204.4; 394.4]	116.5 [88.7; 269.3]	0.074	41.2 [37.9; 44]	36.7 [34.1; 37]	46.4 [38.4; 50.8]	0.091
RC-POST	86.5 [80.3; 117.3]	76 [72.5; 77]	61.5 [51; 73]	0.105	289.05 [268.5; 294.4]	208.1 [194; 218.9]	181.6 [103.75; 229.5]	0.050	47.5 [40.9; 49.8]	52.3 [50.7; 66.85]	51.25 [49.75; 69.9]	0.174
General	94## [85.5; 140]	76** [68; 90]	65## [50; 75]	<0.001	288.2* [199.2; 324.6]	228.1 [199.2; 324.6]	195.3** [129.4; 271.9]	0.005	44.6 [36.6; 49.4]	43.7 [36.7; 43.7]	48.7 [33.9; 51.5]	0.801

The values are described as median ± interquartile range. SHAM group did not have reperfusion and was observed for 120minutes. t₂: five minutes after reperfusion; Final: 120 minutes after reperfusion.

MAP: mean arterial pressure; PaCO₂: partial pressure of arterial carbon dioxide; PaO₂: partial pressure of arterial oxygen.

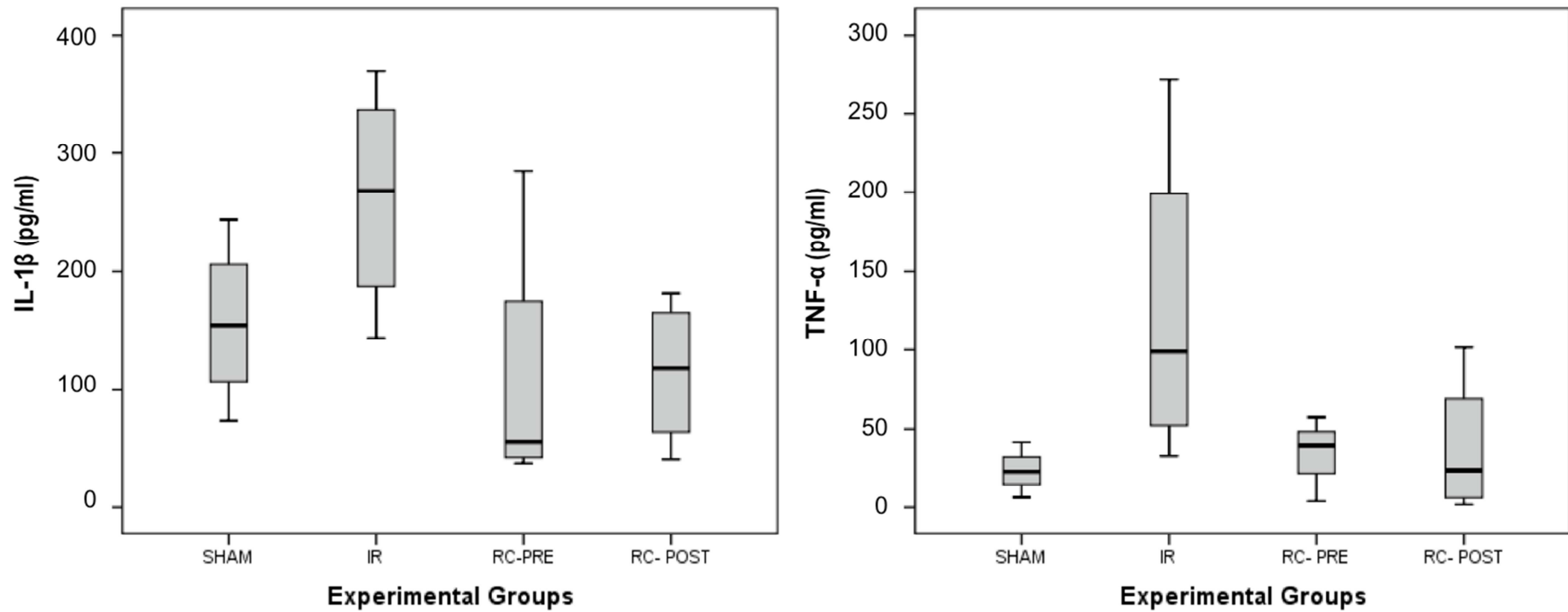


Figure 1 - IL-1 β and TNF- α protein expression. There was no significant differences in lung tissue protein expression among the groups in IL-1 β ($P = 0.159$) and TNF- α ($P= 0.260$). Data are presented as median \pm standard error of the median.

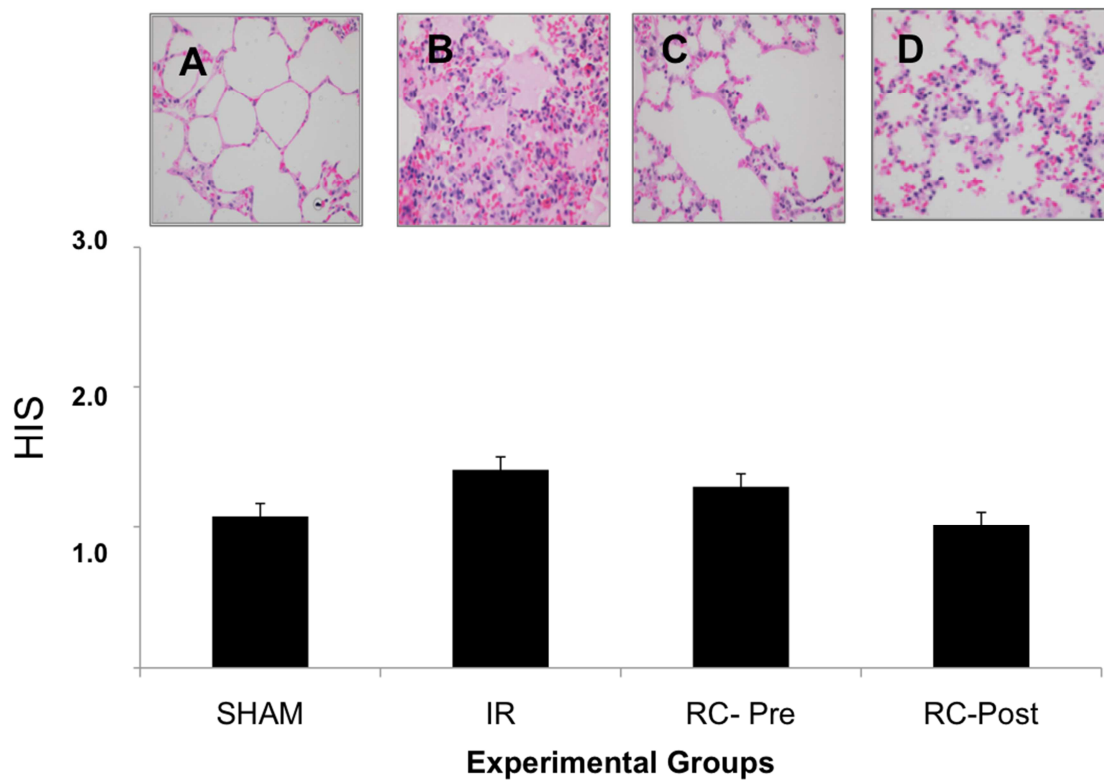


Figure 2– Photomicrograph of the lung in the different experimental groups. The histological score (HIS) showed no significant difference between groups ($P = 0.973$). (A:SHAM, B:IR, C:RC-Pre and D:RC-Post, magnification x 100)

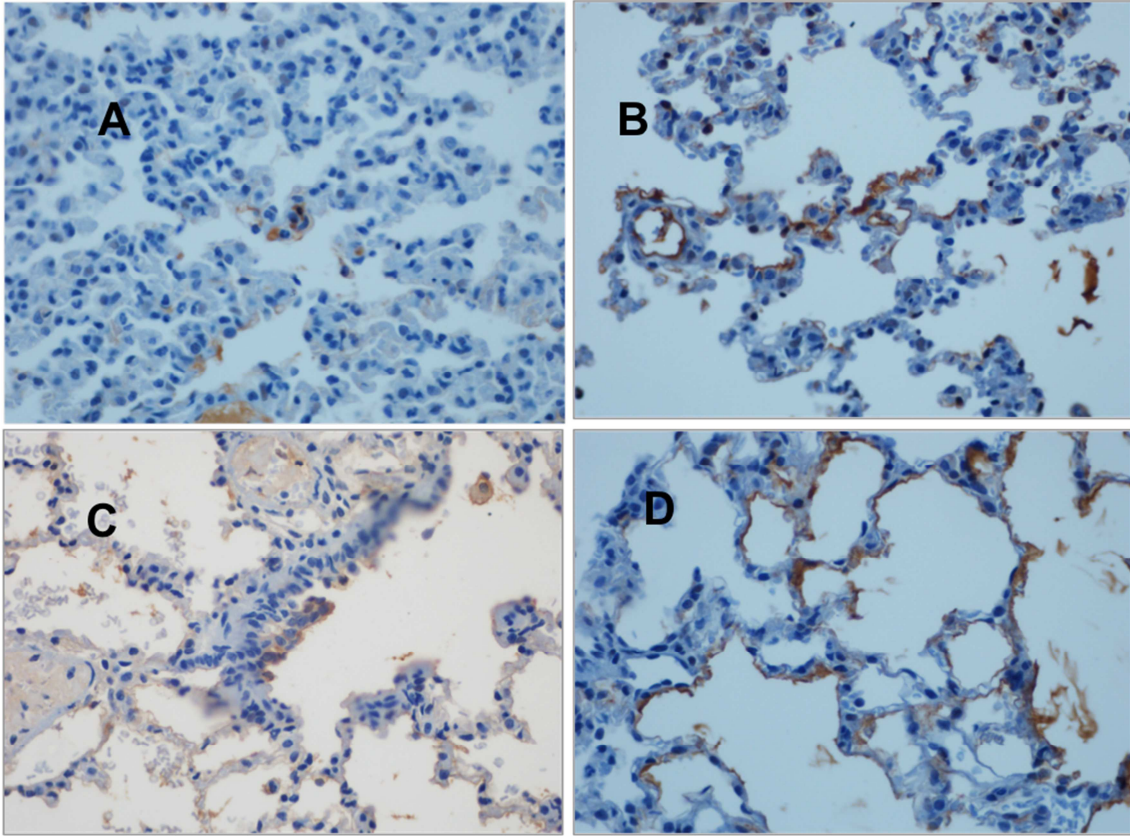


Figure 3 - Immunohistochemical staining for Cleaved Caspase 9. There was maximum expression of brown-positive cells in pneumocytes specially in the RC-POST group (D). (A: SHAM; B: IR; C: RC-PRE; and D: RC-POST magnification $\times 200$).

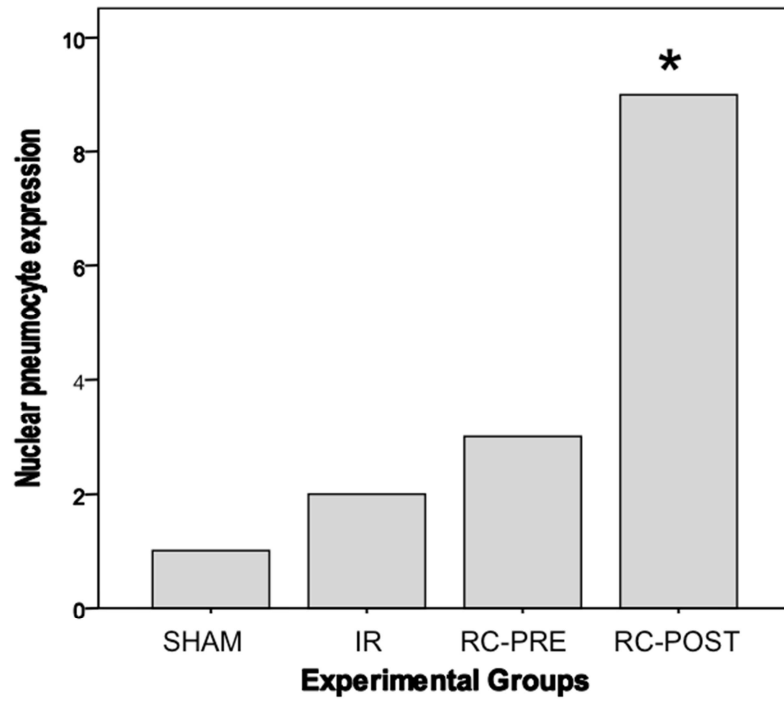


Figure 4 - Cleaved Caspase 9 pneumocyte expression in lung tissues. The RC-Post IR group exhibited a significant overexpression of cleaved caspase 9 ($P < 0.013$) compared to the other groups. Data are presented as the median \pm standard error of the median.

7. DISCUSSÃO

A principal razão que incitou a realização deste estudo foi a inexistência de citações, na literatura, de experimentos com prognóstico promissor de intervenção de fármaco para diminuir o dano decorrente de processo inflamatório agudo.

Neste trabalho, se pretendeu quantificar as citocinas IL-1 β e TNF- α na lesão de reperfusão em ratos para avaliar o efeito do antagonista do receptor de liberador de gastrina em processo inflamatório agudo. O estudo das citocinas tem sido realizado com frequência por serem consideradas importantes para o diagnóstico de enfermidades na investigação da imunidade protetora, na modulação da resposta imune a vacinas e no desenvolvimento de modelos pré-clínicos para as doenças humanas⁸⁹.

Uma resposta diferencial era esperada na lesão de reperfusão do pulmão em ratos, derivada do fato que o RC-3095 ter efeito na regulação negativa de citosinas pró-inflamatórias em estudos com doenças crônica e autoimune como sepse⁸¹ e artrite⁸². No entanto, não fomos capazes de demonstrar esse achado no presente estudo.

Além de avaliar o efeito protetor do RC-3095 em um modelo de inflamação aguda induzida, nos propusemos analisar sua influência sob a morte celular, ou apoptose, e aprofundar dados sobre a toxicidade da molécula em estudo.

Há dois mecanismos chave por meio dos quais as células podem ser levadas a apoptose – a via intrínseca e extrínseca. A via extrínseca é tipicamente a via que o sistema imune utiliza para destruir células doentes. Ela é ativada por moléculas extracelulares que são ligadas a receptores de membrana que entre outros inclui o fator de necrose tumoral (TNF- α). Ocorrendo esta ligação há uma sinalização de estímulo as caspase 8 e 10, que por sua vez clivam caspase 3 e 7. Uma vez efetivado este gatilho essas caspases são em última instância as responsáveis por dar sequência à morte celular irreversível.

A via intrínseca é iniciada por múltiplos estímulos sinalizadores de dano celular incluindo irradiação ionizante, agentes citotóxicos, hipóxia, dano ao DNA, e supressão do fator de crescimento. A etapa crítica desta via é a permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias. Quando há desequilíbrio entre proteínas pró- ou anti apoptótica consequentemente falha o sistema de proteção que permite que grande número de substratos ativos saia de dentro da mitocôndria para o citoplasma. Entre outras organelas se inclui o citocromo c que por sua vez ativa uma enzima promotora da apoptose (APAF-1) que se liga a caspase-9 formando o apoptosoma. Então, o apoptosoma age clivando a caspase-3 e 7 e novamente é efetivada a morte celular irreversível⁹⁰.

Neste estudo, foi investigado a caspase-9 por atuar na apoptose em uma fase inicial como um gatilho para morte celular que ocorre somente quando a caspase-3 é clivada. A caspase-9 clivada é um indicativo de ativação pela via mitocondrial, que pode ser também consequência da sinalização de dano ao DNA ou hipóxia entre outros fatores. Portanto, maiores expressões observadas junto a administração do RC pós IR provavelmente devem estar associadas à hipoxia decorrente ao tempo de isquemia. Células desprovidas de ATP sofrem necrose em vez de apoptose em resposta a estímulos apoptóticos⁹⁰.

As expressões mais altas da caspase-9 foram observadas somente quando o RC-3095 foi administrado após IR. Consistente com o aumento de atividade da caspase-3 após 45 minutos de isquemia, isso foi demonstrado em estudo com modelo semelhante, refletindo em maior número de células apoptóticas. Por outro lado, após 60 min. de isquemia, o mesmo estudo observou mínima atividade da caspase-3, porém havia uma enorme presença de células necróticas⁸⁶.

Como o foco do estudo foi avaliar uma possível associação do RC-3095 na diminuição de dano decorrente de processo inflamatório agudo, a outra proposta do experimento foi estudar a atividade do óxido nítrico neste contexto.

As enzimas NO sintases (NOS), hemoproteínas da família citocromo P450, são fundamentais para biossíntese do óxido nítrico. São conhecidas três principais isoformas dessas enzimas, sendo duas delas constitutivas, presentes

em condições fisiológicas no endotélio e nos neurônios, e uma enzima sendo indutível, que se expressa nos macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores. Suas siglas são, respectivamente, cNOS (nNOS, eNOS) e iNOS. São três enzimas estruturalmente semelhantes, porém reguladas de forma diversa e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I ou nNOS), 12 (isoforma II ou iNOS) e 17 (isoforma III ou eNOS)⁹².

Um estudo anterior com modelo similar de lesão por IR em ratos⁹³ observou reduções nas expressões da iNOS após administração de aminoguanidina, um inibidor seletivo da NO-sintase, que também mostrou o papel da enzima sob a permeabilidade vascular e o influxo de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos pela enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB) em camundongos⁹³.

A iNOS também exerce importante papel na manutenção da homeostase fisiológica no endotélio do sistema vascular. O NO mantém o calibre brônquico e regula a frequência dos movimentos ciliares; na circulação pulmonar, o NO equilibra a relação ventilação-perfusão. A iNOS epitelial bronquial é responsável pela defesa imunológica a agentes externos inalados, principalmente pelo recrutamento de macrófagos epiteliais e subepiteliais. Isto é configurado pela queda da resistência às infecções broncopulmonares com administração de análogos da L-arginina *in vitro* e *in vivo*⁹⁴.

Em culturas de células alveolares pulmonares epithelium-like, Asano *et al.* demonstraram atividade basal de NOS constatada como isoforma I ou nNOS, não se constatando eNOS ou isoforma III. Em outro estudo com o mesmo modelo experimental, porém utilizando a N-Acetylcysteine, Forgiarini LF *et al.* demonstraram que após 120 min de reperfusão os níveis de iNOS ficaram aumentados em todos os grupos, quase uniformemente, comparados ao SHAM.

Considera-se o NO-mensageiro produzido a partir da cNOS (nNOS, eNOS) como responsável pela homeostase das vias aéreas e por isso a eNOS foi alvo neste experimento⁹². O nosso estudo permitiu demonstrar igual atividade da eNOS no endotélio do pulmão de ratos em todos os grupos, experimental e controle, sem diferença estatística. Isso nos leva a concluir que apesar de haver variação significativa da pressão arterial nos animais do grupo RC-Pós em relação aos outros grupos, parece que o RC-3095 não influenciou negativamente a homeostase pulmonar durante o experimento.

8. CONCLUSÕES

8.1. Conclusão Geral

A análise dos resultados obtidos não evidencia a ocorrência de um efeito protetor significativo com a utilização do RC-3095 na resposta inflamatória em pulmões de ratos submetidos à IR.

8.2. Conclusões específicas

a) Observou-se redução significativa na PaO₂ nos grupos IR, e RC-pré e pós-IR, quando comparado com valores antes da reperfusão ($p= 0,02$). O grupo que recebeu RC Pós-IR apresentou uma redução significativa na PaO₂, quando comparado com todos os outros grupos ($p= 0,04$).

b) Não houve diferença estatística entre as médias dos escores histológicos entre os diferentes grupos, ainda que houvesse uma discreta diminuição na frequência média desses escores nos grupos RC Pré-IR e Pós-IR em relação aos observados nos grupos IR e SHAM.

c) Os grupos RC Pré-IR e Pós-IR mostraram redução sem significância estatística nos níveis séricos de IL-1 β ($p = 0.159$) e TNF- α ($p= 0.260$), quando comparado com o grupo IR.

d) Não houve diferença significativa na captação da eNOS entre os grupos ($p= 0.206$).

e) Observou-se maior expressão de caspase -9 clivada apenas no grupo RC Pós-IR ($p > 0.013$), quando comparado aos demais grupos.

9. COMENTÁRIOS FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o uso de RC-3095 não trouxe efeito protetor no modelo de IR induzida em ratos, nas condições experimentais utilizadas. Foi possível demonstrar a ocorrência dos danos característicos, decorrentes da indução de IR neste modelo, os quais não foram influenciados pela presença do RC-3095. Considerando a relevância clínica do tema, novos estudos explorando outros potenciais alvos terapêuticos nesta condição são recomendados.

REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Botter M, Saad Jr R. Transplante pulmonar: o estado da arte. In: Saad Jr R, Carvalho WR, Ximenes Netto M, Forte V. Cirurgia torácica geral. São Paulo: Atheneu; 2005.
2. American Thoracic Society, <http://www.thoracic.org/statements>. Ats, Documents, statements, guidelines & reports; 1998.
3. Camargo JJ, Schio SM, Sanches L. Transplante de pulmão: conceitos e rotinas. In: Camargo JJ, Pinto Filho DR. Tópicos de atualização em cirurgia torácica. São Paulo: FMO; 2011.p. 394-401.
4. Jatene, FB. Pego - Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonar. [editorial]. J Brasil Pneumol. 2008; 34 (5): 249 – 50.
5. Registro Brasileiro de transplantes, 2014; XX(1) jan - mar [citado jun.2014]. Disponível em: <http://www.abto.org.br>.
6. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. J Lab Clin Med. 2000 136: 427 – 40.
7. Conte, JV and Baumgartner, WA. Overview and future practice patterns in cardiac and pulmonary preservation. J Cardiovasc Surg (Torino) 2000 (15) 91 –
8. Della Rocca G, Pierconti F, Costa MG, Coccia C, Pompei L, Rocco M, Venuta F, Pitroccoli P. Severe reperfusion lung injury after double lung transplantation. Crit Care 2002 Jun; 6(3):240 – 4.
9. Heffner, JA and Repine JE. State of the art: pulmonary strategies of antioxidant defense. Am Rev Respir Dis. 1989 140:531 – 54.
10. Varela de Ugarte A. Primary graft failure following lung transplantation: is there hope for improvement? Arch Bronconeumol. 2005 Sep; 41 (9):473-4
11. Rahman, I; Marwick, J; Kirkham, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kB and pro-inflammatory gene expression. Biochemical Pharmacology.2004 (68):1255 – 67.
12. Chistie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO *et al*. The registry of international society for heart and lung transplantation: twenty – sixty official adult lung transplantation and heart report – 2009. J Heart Lung Transplant. 2009; 28: 1031 – 49.

13. Silva OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta cir. Bras.* 2002; 17 (supl 3): 96 – 100.
14. Korm S, Hillinger S, Cardell M, Zhai W, Tan Q, Dutly A, Leskosec B, Weder W. Sildenafil extends survival and graft function in a large animal lung transplantation model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Mar.
15. Köster T, Mörike C, v Hörsten S, Martin U, Bader M, Haverich A, Simon AR. Pravastatin prolongs graft survival in an allogenic rat model of orthotopic single lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Sep; 30(3): 515 – 24.
16. De Perrot M, Fisher S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK *et al.* Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro-to anti inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001 Nov 15(72): 1505-12.
17. Andrade C. Impacto da ventilação líquida parcial com perfluorocarbono após a reperfusão do enxerto em modelo canino de transplante pulmonar unilateral esquerdo. [dissertação] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Departamento de Pneumologia; 2001. 89 p.
18. LF Forgiarini, LA Forgiarini, da Rosa DP, Silva M.B, Mariano R, Paludo AD, Andrade CF. N-Acetylcysteine administration confers lung protection in different phases of lung ischemia-reperfusion injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014 Online ISSN 1569-9285 - Print ISSN 1569-9293
19. Zhao Y; Sharma AK, LaPar DJ, Kron IL, Ailawadi G, Liu Y, Jones DR, Laubach VE, Lau CL. Depletion of tissue plasminogen activator attenuates lung ischemia-reperfusion injury via inhibition of neutrophil extravasation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300(5):18-29.
20. Uchida Y, Freitas MC, Zhao D, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. The protective function of neutrophil elastase inhibitor in liver ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2010, 89(9):1050 - 6.
21. Schwartzmann G, Di Leone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancellà AI, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Souza FH, Pohlmann P, De Nucci G. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs.* 2006 Sep; 24(5):403 -12.

22. Moreira F, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 173: 84-90.
23. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7:416 – 26.
24. Oliveira PG, Grespan R, Pinto PG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, Cunha FQ, Schwartzmann G, Xavier RM. Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis. *Arth Reum*. 2011 63(10): 2956 – 65.
25. Damin DC, Santos FC, Heck R, Rosito MA, *et al*. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. 2010; 55, (8) 2203 – 10.
26. Pereira DV, Steckert AV, Mina F, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Ritter C, Dal-Pizzol F. Effects of an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor in an animal model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Nov;50(11):5300-3.
27. Pinheiro BV, Holanda MA, Araújo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. *J Pneumol*.1999; 25(2):124 – 136.
28. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *AJP*. 2003; 162(2): 363 – 367.
29. Evora PR, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importancia da função endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 66(4): 239 – 245.
30. Fisher AB, Dodia C, Tan Z, Ayne I, Eckenhoff RG. Oxigen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest*. 2000; 105(10):1363 – 1371.
31. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA phospholipase A₂ mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Annals of Surgery* 2000; 323(1): 90 -7.
32. Fisher AB. Reactive oxygen species an cell signaling with lung ischemia. *UHM*. 2004 31(1): 97-103.
33. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001; 94(6): 1133 – 1138.

34. Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting. *Circ J*. 2011, 75: 1287 – 96.
35. Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2006; 6:652 – 58.
36. Chaumoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci*. 2000; 5: 103 – 109.
37. Huang Y, Shan J, Wang C, Ma J, Li Dan, Li L *et al*. Can ischemic preconditioning alone really protect organs from ischemia reperfusion injury in transplantation? *Transplant Immunology*. 2009; 20: 127 – 131.
38. Zhao G, Al-Mehdi AB, Fisher AB. Anoxia – reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am j Physiol*. 1997; 1122 – 17.
39. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia – reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009 23(1):1 -10.
40. Botha P, Jeyakanthan M, Rao JN, Fisher AJ, Prabhu M, Dark JH *et al* Inhaled nitric oxide for modulation of ischemia – reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26(11): 1199 – 1205.
41. Rosen DM, Lee JH, Cuttitta F, Rafiqi F, Degan S, Sunday, ME. Accelerated thymic maturation and autoreactive T cells in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006, 174: 75 – 83.
42. Takeyoshi I, Iwanami K, Kamoshita N, Takanashi T, Kobayashi T, Kobayashi j, Tomizawa N *et al*. Effect of lazardoid U-74389G on pulmonary ischemia – reperfusion injury in dogs. *J Inv Surg*. 2001; 14:83 – 92.
43. Anastasi A, Esparmer V. and Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experimentia (Basel)*. 1971 27:166 – 67.
44. Tokita K, Katsuno T, Hocart SJ, Coy DH, Llinares M, Martinez J, *et al*. Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36652-63.

45. Mc Donald TJ, Nilson G, Vagne M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin - releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut*. 1978, 19:767 – 74.
46. Bjornskov-Bartholdy, Bersani M, Holst JJ. Identification, characterization and release of GRP gene-associated peptides from the normal porcine and human gastro-intestinal tract. *Regul Pept*. 1991Jul 9;34(3):197-209.
47. Hernanz A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochemd Cell Biology*. 1990, 68(9): 1142 - 45, 10.1139/o90-170.
48. Ohki-Hamazaki H; Iwabuchi M; Maekaw F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol*. 2005, 49: 293 – 300.
49. Qin, Y. Ertl, T. Cai, R. Z., Halmos, G. and Schally, A. V. Inhibitory effect of bombesin antagonist RS - 9035 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vivo. *Cancer Res*. 54: 1035 - 41, 1994.
50. Sunday ME, Yoder BA, Cuttitta , Haley KJ, Emanuel RL. Bombesin-like peptide mediates lung injury in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest*. 1998; 102:584 – 94.
51. Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989; 63: 1714 – 20.
52. Pinski, J., Yano, T., Groot, K., Cai, R. Z., Radulovic, S. and Schally, A. V. Endocrine effects of new bombesin / gastrin - releasing peptide antagonists in rats. *Am. J. Physiol*. 263 (4Pt 1) : E712 - 7, 1992.
53. Czepielewski, RS; Porto, BN; Rizzo, L; Roesler, R; Schwartzmann, G; Garcia, LP; Cunha, FQ; Bonorino, C. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) – a new chemotactic receptor for neutrophil migration. *Biological Sciences Immunology*, in press. 2011.
54. Cornelio D, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol*. 2007 18: 1457 – 66.
55. Battey JF, Way JM, Corjay MH. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Br J Cancer*. 1991; 82: 124 – 130.
56. Roesler R; Henriques, JA; Schwartzmann, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006 5:197- 204.

57. De La Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life sciences*. 2000; 67(17): 2125 – 35.
58. Medina S, Del Rio M, Fernandez MD, Hernanz A. Changes with age in the modulation of natural killer activity of murine leukocytes by gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide. *Neuropeptides*. 1998; 32(6):549 – 55.
59. Degan S, Lopez GY, Kevill K. Gastrin-Releasing peptide, immune responses, and lung disease. Neural signaling opportunities for novel diagnostic approaches and therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Nov 2008 (1144)136 – 47.
60. Subramaniam M, Sugiyama K, Coy DH, Kong Y, Miller YE, Weller PF, Wada K, Wada E, Sunday ME. Bombesin-like peptides and mast cell responses: Relevance to bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003, 168:601– 11.
61. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist, S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7:416 – 26.
62. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1766: 23 – 41.
63. Kang J, Ishola TA, Baregamian N, Mourot JM, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Bombesin induces angiogenesis and neuroblastoma growth. *Cancer Letters*. 2007; 253: 273 – 81.
64. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005; (3): 238 – 50.
65. O'connor TM, O'connell J, O'brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in Inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004; 201:167 – 80.
66. Dal-Pizzol F. Alternative activated macrophage: A new key for systemic inflammatory response syndrome and sepsis treatment? *Critical Care Medicine*. 2004; 32(9): 1971 – 72.

67. Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, *et al* . The Nociceptin/Orphanin FQ receptor antagonist UFP-101 Reduces microvascular inflammation to lipopolysaccharide *in vivo*. *Intensiv Care Med*. 2008; 34: 2284 – 90.
68. Bedoui S, von Hörsten S, Gebhardt T. A role for neuropeptide Y (NPY) in phagocytosis: Implications for innate and adaptive immunity. *Peptides*. 2007; 28:373 – 76.
69. Gonzales E, Varela N, Chorny A, Delgado M. Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator *Curr Pharm Des*. 2007; 13(11): 1113-39. Review
70. Subramaniam M, Bausch C, Twomey A, Andreeva S, Yoder BA, Chang L, Crapo JD, Pierce RA, Cuttitta F, Sunday ME. Bombesin-like peptides modulate alveolarization and angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176:902 – 12.
71. Rosen N, She QB. AKT and cancer--is it all mTOR? *Cancer Cell*. 2006 Oct; 10 (4):254-6.
72. Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatel MA, Solcia E, Brown MR, Pearse AG. Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature*. 1978 273:769 – 70.
73. Genton, L e Kudsk, KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg*. 2003; 186:253 – 58.
74. Dal Pizzol F, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory Diseases. *Inflammation & Allergy- Drug Targets*. 2007 ;(6)4: 197 - 200.
75. Lebacqz - Verhayden AM, Trepel J, Sausville EA, Battey JF. Bombesin and Gastrin - Realising Peptide:Neuropeptides,Secretogogues, and Growth Factors. *Handbook of Experimental Pharmacology* 95 (II): Chapter
76. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A , Minna JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature*. 1985; 316:823 – 36.
77. Radulovic, S., Chai, R.Z., Serfozo, P., Groot, K., Redding, T.W., Pinski,J.,and Schally, A.V. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin / GRP receptor antagonists with N - terminal D- Trp or D-Tpi. *Int. J. Peptide Protein Res*. 38:593-600, 1991.

78. Qin Y, Halmos G, Cai RZ, Szoke B, Ertl T, Schally AV. Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J. Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 120: 519 – 28.
79. Pinski, J, Yano, T, Schally, A. V. Inhibitory effects of new bombesin receptor antagonist RC - 3095 on the luteinizing hormone release in rats. *Neuroendocrinology.* 1992; 56: 831 – 7.
80. Pinski J, Yano T, Groot K, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. Endocrine effects of new bombesin / gastrin - releasing peptide antagonists in rats. *Am. J. Physiol.* 1992, 263 (4Pt 1): 712 – 7.
81. Petronilho F, Vuolo F, Galant LS, Constantino L, Tomasi CD, Giombelli VR, de Souza CT, da Silva S, Barbeiro DF, Soriano FG, Streck EL, Ritter C, Zanotto-Filho A, Pasquali MA, Gelain DP, Rybarczyk-Filho JL, Moreira JC, Block NL, Roesler R, Schwartzmann G, Schally AV, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide receptor antagonism induces protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling. *Mol Med*, Oct 2012;(24)18:1209-19.
82. Petronilho F, Danielski LG, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide as a molecular target for inflammatory diseases: an update. Review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013 Jun;12(3):172-7.
83. Felix EA, Andrade CF, Cardoso PF, Thiesen GC, Antonio AC, Martins LK, et al. Ventilation strategy and its influence on the functional performance of lung grafts in an experimental model of single lung transplantation using non-heart-beating donors. *J Bras Pneumol* 2010;36:554-61.
84. Erne BV, Jungraithmayr W, Buschmann J, Arni S, Weder W, Inci I. Effect of N-Acetylcysteine on Acute Allograft Rejection After Rat Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg* 2013:1021-7.
85. Kohmann J, Castro M, Silva U, Ruschel M, Madruga G, Felicetti J, et al. Antegrade versus retrograde lung perfusion in pulmonary preservation for transplantation in a canine model of post-mortem lung viability. *J Pneumol.* 1995; 20(3): 145.
86. Fogiarini LA Jr., Grün G, Kretzmann NA, de Muñoz GA, de Almeida A, Forgiarini LF, Andrade CF. When is injury potentially reversible in a lung ischemia–reperfusion model? *J Surg Res.* 2013 179(1): 168 – 74.

National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals – Portuguese Edition Washington, DC: The National Academies Press; 1996.

87. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 248 – 54.

88. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 162 650 – 57.

89. Scheerlinck J-P. Y. and H-H. Yen (2005). Veterinary Applications of Cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:1-2, 17–22.

90. Ziegler, Kung, Kierem. Anti-Apoptosis Mechanisms in malignant gliomas, *J Clin Oncol*, 2008. 26(3): 493 – 500.

91.

92. Flora Filho R, Zilberstein B, Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 2000; 46(3): 265 -71.

93. Yeh DY, Feng NH, Chen CF, Lin HI, Wang D. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. *Transplant Proc.*2008;40:2178.

94. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987: 235: 473 – 76.

Anexos

Protocolo do teste de ELISA IL-1

1. Revestir a placa com 100 μL /poço com o Anticorpo de Captura diluído no tampão de revestimento (*Coating Buffer*) e diluir conforme a bula (Certificado de Análise). Selar a placa e incubar a 4° C, *overnight*.
2. Aspirar os poços e lavar 5 X com ≥ 250 μL /poço de solução de lavagem. Durante cada seqüência de lavagem, deixar a placa com a solução de lavagem por aproximadamente um minuto.
3. Diluir o diluente do kit numa proporção 1:5 com água deionizada. Bloquear as placas com 200 μL /poço de 1x da solução com o diluente do kit (*Assay Diluent*). Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
4. Aspirar e lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
5. Utilizando 1 x *Assay Diluent*, diluir os padrões conforme a bula do fabricante (Certificado de Análise). Adicionar 100 μL /poço de amostras conforme o desenho da placa. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente por 2 horas (ou durante uma noite a 4° C, para aumentar a sensibilidade).
6. Aspirar /lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
7. Adicionar 100 μL /poço do anticorpo de detecção diluído 1 x no *Assay Diluent*. Selar a placa e incubar em temperatura ambiente por 30 minutos.
8. Aspirar e lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
9. Adicionar 100 μL /poço da Solução de avidina-HRP (reagente enzimático) diluído no diluente do ensaio 1 x. Selar e incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Aspirar e lavar conforme o item 2. Durante cada seqüência de lavagem deixar a placa com a solução de lavagem por aproximadamente um minuto. Repetir um total de 7 lavagens.
11. Adicionar 100 μL /poço da Solução de substrato. Selar e incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.

12. Adicionar 50 μL /poço de solução de parada (*Stop Solution*) para interromper o ensaio;

13. Fazer a leitura em leitor de ELISA em um comprimento de onda de 450nm dentro de 30 minutos após o término do ensaio. Obter a absorbância subtraindo de 450nm a absorbância de 570nm para analisar os dados.

Protocolo do teste de ELISA TNF- α

1. Revestir a placa com 100 μ L/poço com o Anticorpo de Captura diluído no tampão (*Coating Buffer*). Para realizar a diluição seguir a bula do fabricante. Selar a placa e incubar a 4° C, *overnight*.
 2. Aspirar os poços e lavar 5 X com \geq 300 μ L/poço de solução de lavagem. Durante cada seqüência de lavagem, deixar a placa com a solução de lavagem por aproximadamente um minuto.
 3. Bloquear a placa com \geq 200 μ L/poço da solução com o diluente do kit (*Assay Diluent*). Incubar a temperatura ambiente por uma hora;
 4. Aspirar e lavar conforme o item 2. Repetir um total de 5 lavagens.
 5. Preparar os padrões de diluição das amostras usando o tampão conforme a bula do fabricante.
 6. Adicionar 100 μ L/poço de cada padrão, amostra e controle no poço apropriado. Selar a placa e incubar em temperatura ambiente por duas horas.
 7. Aspirar e lavar conforme o item 2, com 5 lavagens no total.
 8. Adicionar 100 μ L/poço do Anticorpo de Detecção diluído em cada poço Selar a placa e incubar em temperatura ambiente por 1 hora;
 9. Aspirar e lavar conforme item 3, com um total de 5 lavagens;
 10. Adicionar 100 μ L/poço do reagente enzimático diluído (SAv-HRP) em cada poço. Selar a placa na placa e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.
 11. Aspirar e lavar conforme o item 2, e repetir no total 7 lavagens. A cada lavagem deixar a placa na solução por 30 segundos a um minuto;
- *Obs.: Muito importante nesta lavagem final deixar a placa na solução de lavagem por 30 segundos a 1 minuto;

12. Adicionar 100 μL /poço de solução com o substrato TMB. Incubar a placa (sem selar) por 30 minutos a temperatura ambiente, deixando-a no escuro.

13. Adicionar 50 μL /poço de solução de parada para interromper o ensaio.

14. Efetuar a leitura em leitor de placas ELISA de 96 poços após 30 minutos do termino da reação. Obter a absorbância a um de comprimento de onda de 450nm. Fazer correção, subtraindo de 450nm a absorbância de 570nm para analisar os dados.

Tabela 1. Hemodinâmica – análise dos dados entre os grupos

Tabela 2. Hemodinâmica - análise dos dados de tempo em relação aos grupos

Tabela 3. Planilha com as observações das lâminas através da análise realizada por imunohistoquímica - Captação da Caspase-9

Tabela 4. Planilha com as observações das lâminas da análise realizada por imunohistoquímica - Captação da eNOS

TABELA 1 - Comparação dos grupos em relação aos tempos

	MAP			p	Pao ₂			p	Paco ₂			p
	Baseline	t2	Final		Baseline	t2	Final		Baseline	t2	Final	
Grupo1	94 [90; 140]	90 [75; 103]	86 [73,5; 90]	0,165	342,2 [265,2; 353,9]	278,6 [231,4; 300,5]	300,6 [255,95; 378,15]	0,368	47,4 [44,6; 49,9]	44,9 [43,7; 48,9]	47,5 [45,45; 50,8]	0,779
Grupo2	110* [96; 151]	81 [73; 90]	65** [64; 75]	0,007	187,1 [148,6; 318,4]	228,1 [171,9; 348]	149,1 [147,4; 161,2]	0,449	35,9 [32,5; 44,9]	39,9 [34,1; 44,4]	20,7 [20,5; 49,7]	0,819
Grupo3	93* [85,5; 125]	67,5 [62; 73]	46** [45; 53]	0,015	282,3 [251,2; 341,7]	223,7 [204,4; 394,4]	116,5 [88,7; 269,3]	0,074	41,2 [37,9; 44]	36,7 [34,1; 37]	46,4 [38,4; 50,8]	0,091
Grupo4	86,5 [80,3; 117,3]	76 [72,5; 77]	61,5 [51; 73]	0,105	289,05 [268,5; 294,4]	208,1 [194; 218,9]	181,6 [103,75; 229,5]	0,050	47,5 [40,9; 49,8]	52,3 [50,7; 66,85]	51,25 [49,75; 69,9]	0,174
Geral	94 [85,5; 140]		**	<0,001	*		**	0,005				0,801

Os símbolos iguais sinalizam diferenças estatísticas entre tempos.

TABELA 2 - Comparação dos tempos em relação aos grupos

	MAP			Pao ₂			Paco ₂		
	Baseline	t2	Final	Baseline	t2	Final	Baseline	t2	Final
Grupo1	94 [90; 140]	90 [75; 103]	86 [73,5; 90]	342, [265,2; 353,9]	278,6 [231,4; 300,5]	300,6 [255,95; 378,15]	47,4 [44,6; 49,9]	44,9 [43,7; 48,9]	47,5 [45,45; 50,8]
Grupo2	110 [96; 151]	81 [73; 90]	65 [64; 75]	187,1 [148,6; 318,4]	228,1 [171,9; 348]	149,1 [147,4; 161,2]	35,9 [32,5; 44,9]	39,9 [34,1; 44,4]	20,7 [20,5; 49,7]
Grupo3	93 [85,5; 125]	67,5 [62; 73]	46 [45; 53]	282,3 [251,2; 341,7]	223,7 [204,4; 394,4]	116,5 [88,7; 269,3]	41,2 [37,9; 44]	36,7* [34,1; 37]	46,4 [38,4; 50,8]
Grupo4	86,5 [80,3; 117,3]	76 [72,5; 77]	61,5 [51; 73]	289,05 [268,5; 294,4]	208,1 [194; 218,9]	181,6 [103,75; 229,5]	47,5 [40,9; 49,8]	52,3** [50,7; 66,85]	51,25 [49,75; 69,9]
p	0,537	0,122	0,137	0,594	0,668	0,082	0,207	0,01	0,294

Os símbolos iguais sinalizam diferenças estatísticas entre grupos.

Grupos	ANIMAL	Endot LSD	Endot LSE	Pneum LSD	Pneu LSE	Estrom LSD	Estrom LSE	Macróf LSD	Macróf LSE	Neutrófilo LSE	Neutrófilo LSD	Cels Bronq LSD	Cels Bronq LSE	Linf LSD	Linf LSE
	12			Nff	Nff										
SHAM	13			Nff	0					Nff					
	17			NFD	NFD										
	24			0	0										
	28			0	0										
	14			NFF	NFF										
IR	16			0	0										
	19			0	0										
	26			NFF	0										
	29			0	0										
	20			0	0										
RC Pre-IR	27			0	0										
	6			0	0										
	8			NFF	0										
	15			0	NFF								NFF		NFF
	31			NFF	NFF										
RC Pós-IR	3			NFF	NFD							NFD	NFD		
	9			NFF	NFF										
	10			NFF	NFD							NFD			
	25			NFF	NFF										
	30			0	NFF										
Captação de Caspase-9															

Grupos	ANIMAL	Endotélio LSD	Endotélio LSE	Pneumócito LSD	Pneumócito LSE	Estroma LSD	Estroma LSE	Macrófago LSD	Macrófago LSE	Neutrófilo LSD	Neutrófilo LSE
	12	CFD	CFD								
SHAM	13	CFD	CFD								
	17	CFD	CFD								
	24	CFF	CFF								
	28	CFF	CFF								
	14	CFD	CFD								
IR	16	CFF	CFD					CFF	MFF		
	19	CFF	CFD								
	26	CFF	CFF								
	29	CFD	CFF								
	20	CFF	CFF								
RC Pre-IR	27	CFF	CFF								
	6	CFF	CFF								
	8	CFD	CFD					CFF			
	15	CFF	CFD								
	31	CFF	CFF					CFF			
RC Pós-IR	3	CFD	CFD								
	9	CFF	CFF								
	10	CFD	CFF								
	25	CFD	CFD						CFF		
	30	CFF	CFF					CFF			
Captação de eNOS											

Nome do arquivo: TESE Vera Lorentz Versão com Artigo
Diretório: C:\Documents and Settings\vlfreitas\Desktop
Modelo: C:\Documents and Settings\vlfreitas\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dotm
Título: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Assunto:
Autor: Vera Lorentz de Oliveira Freitas
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 14/11/2014 11:05:00
Número de alterações:2
Última gravação: 14/11/2014 11:05:00
Salvo por: Vera Lorentz De Oliveira Freitas
Tempo total de edição: 2 Minutos
Última impressão: 14/11/2014 11:09:00
Como a última impressão
Número de páginas: 80
Número de palavras: 23.002 (aprox.)
Número de caracteres: 124.216 (aprox.)