

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO RC-3095, UM ANTAGONISTA SINTÉTICO
DE RECEPTORES DO TIPO BOMBESINA/FATOR DE LIBERAÇÃO DA
GASTRINA (FLG), NA SEPSE INDUZIDA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Medicina da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul para obtenção do título de
Doutor

LUCIANE PONS DI LEONE

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Co-orientador: Prof. Felipe Dal Pizzol

Porto Alegre, 2004

D576e Di Leone, Luciane Pons

Efeitos da administração do RC-3095, um antagonista sintético de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina (FLG), na sepse induzida em ratos wistar / Luciane Pons Di Leone; orient. Gilberto Schwartzmann; co-orient. Felipe Dal Pizzol. – 2004.

129 f. : il. color.

Dissertação (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Sepse 2. Receptores da bombesina 3. Peptídeo liberador de gastrina I. Schwartzmann, Gilberto II. Dal Pizzol, Felipe III. Título.

NLM: WC 195

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	3
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
PRIMEIRA PARTE	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	12
2.2	<u>18</u>
2.3	<u>19</u>
2.4	20
2.5 <i>Justificativa</i>	22
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	42
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	42
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
SEGUNDA PARTE	60
1. ABSTRACT	62
2. INTRODUCTION	64
3. PATIENTS AND METHODS	66
4. RESULTS	70
5. DISCUSSION	74
6. LITERATURE REFERENCES	77
TERCEIRA PARTE	93
1. RESUMO	95
2. INTRODUÇÃO	97
3. PACIENTES E MÉTODOS	99
4. RESULTADOS	105
5. DISCUSSÃO	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
CONCLUSÕES	127
1. CONCLUSÃO GERAL	127
2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS	128

ABREVIATURAS

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TNF - Fator de Necrose Tumoral

IL-1 – Interleucina-1

EUA – Estados Unidos da América

PAF – Fator de Ativação Plaquetária

NO – Óxido Nítrico

Nos – Óxido Nítrico Sintetase

LPS – Proteína Lipopolissacáride

TLRs - Receptores “toll-like”

CLP - Ligação Cecal e Perfuração

EAO - Espécies Ativas do Oxigênio

O₂ - Superóxido

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

NAC – N-acetilcisteína

DFX – deferoxamina

NF-kB - Fator Nuclear kB

SNC - Sistema Nervoso Central

TGI - Trato Gastrointestinal

GRP - Peptídeo Liberador de Gastrina

NMB - Decapeptídeo neuromedina-B

NMC - Neuromedina C

BNPs - Peptídeos Tipo Bombesina

BN - Bombesina

BN/GRP – Bombesina/ Peptídeo Liberador de Gastrina

CPPC – Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células

CPNPC - Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células

MTX – Metotrexato

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

EGF-R - Receptor Transmembrana Específico do Fator de Crescimento Epidérmico

IGF-I - Fator de Crescimento Tipo-Insulina I

IGF-II - Fator de Crescimento Tipo-Insulina II

RNA_m – RNA mensageiro

TDL - Toxicidade Dose-Limitante

DMT - Dose Máxima Tolerada

SC - Subcutâneo

NCI-CTC - Instituto Nacional do Câncer - Critérios Comuns de Toxicidade

DEDICATÓRIA

*A este novo, intenso e puro amor que conheci:
Ao Filipe, O amor da Dinda.*

*Aos meus pais e irmã, por estarem
sempre presentes na minha vida
e apoiando os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A realização dessa tese é o resultado de um árduo trabalho, que contou com a participação de diversas pessoas. Desejo, portanto, registrar o meu sincero agradecimento àqueles que ajudaram a tornar este sonho realidade.

Aos Profs. Dr. Gilberto Schwartzmann e Dr. Algemir Brunetto, pelo inestimável e constante auxílio, amizade e confiança, pelo incentivo incondicional ao meu crescimento científico, pelos bons conselhos e, por serem eles os responsáveis e impulsionadores desta longa trajetória de minha formação profissional. Tenho grande admiração, respeito, muito orgulho de fazer parte de suas equipes, e principalmente por conviver com profissionais de elevado nível, sendo um dever registrar que os seus exemplos, serviram não somente de inspiração para realização deste trabalho, assim como incentiva-me a buscar a excelência profissional.

Ao Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, por sua co-orientação, dedicação e interesse na realização desta tese em seu laboratório.

Aos meus estimados colegas de trabalho, pela incansável colaboração, apoio e incentivo. Sinto-me privilegiada em trabalhar com pessoas tão especiais.

Aos meus caros amigos, por preencherem minha vida com muito mais alegria.

Ao meu querido Vilela, por seu carinho, cumplicidade e incentivo. Por estar presente em minha vida.

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO

Sepse e suas conseqüências constituem as causas mais comuns de mortalidade em unidades de tratamento intensivo, chegando a taxas de 50-60% a despeito do tratamento utilizado (1, 2). Esta pode ser considerada como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica induzida por infecção, com a presença de dois ou mais dos seguintes critérios: febre ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia, taquicardia, taquipnéia ou hipocapnia. Quando existe uma falência orgânica devido à sepse, conceituamo-na como sepse grave, havendo hipotensão refratária, como choque séptico, e no caso de disfunção em vários órgãos, este é denominado de falência múltipla de órgãos (1, 2, 3, 4).

A resposta do hospedeiro é tão importante quanto o sítio de infecção e o agente causador da sepse. O pulmão é o sítio de infecção mais freqüente, seguido por abdômen e trato urinário, mas em 20-30% dos pacientes o sítio primário não é determinado e mesmo nos pacientes em cujo sítio é altamente suspeito, uma proporção similar tem culturas estéreis ou de significado questionável (1, 2, 3, 4, 5, 6). Pacientes com infecções presumidas ou condições inflamatórias graves não causadas por infecção (p. e. pancreatite), apresentam alterações bioquímicas, fisiológicas, taxas de disfunção orgânica e mortalidade similares, o que vem a dar suporte ao argumento de que a resposta do hospedeiro é o maior determinante de sua evolução clínica.

Drogas antimicrobianas são necessárias, mas não suficientes para o tratamento da sepse, e, paradoxalmente, podem precipitar alterações sépticas pela liberação de produtos microbianos. Pacientes que não recebem prontamente

antibioticoterapia apropriada têm uma mortalidade aumentada em 10-15 %. (1, 2, 4, 6, 7).

A ocorrência de falência orgânica segue um padrão comum: a disfunção pulmonar ocorre quase sempre e precoce, persiste durante o choque, que também ocorre precocemente, e se resolve rapidamente ou é fatal. Sérias anormalidades da função hepática, coagulação e manifestações neurológicas tendem a ocorrer horas ou dias após o início da sepse e persistem por tempo indeterminado (1, 2, 6, 7, 8). O número de falências orgânicas, além da gravidade destas, afeta o prognóstico do paciente, pois cada órgão adicional em falência acrescenta 15-20% na taxa de mortalidade (1, 2, 4, 7, 8). Portanto, o tratamento da falência orgânica é essencial. Entretanto, atualmente este é centrado em medidas de suporte, como ventilação mecânica, reposição volêmica generosa, drogas vasopressoras, suporte nutricional, sedação, diálise e outras medidas (1, 2, 5).

Mesmo na ausência de uma terapêutica específica de impacto significativo na mortalidade, a taxa de mortalidade por sepse e suas complicações vem apresentando uma discreta redução nas últimas décadas, provavelmente devido à melhor definição da síndrome, a incrementos nas medidas de suporte a órgãos-alvo e prevenção de complicações (3, 4).

Segundo dados do XI Congresso Brasileiro de Medicina Intensiva (VIII Fórum Latino-Americano de Ressuscitação e Emergências Cardiovasculares e I Simpósio de Emergências Médicas), realizado em Curitiba, em junho deste ano, a sepse grave é a causa de 70 mil internações ao ano em nosso país. No mundo, a

sepsis mata mais do que a AIDS, o câncer de mama e tanto quanto o infarto do miocárdio (8). Além disso, estima-se que a incidência de sepsis se elevará significativamente nos próximos dez anos. Deve ser considerado também que a sepsis grave é mais comum em idosos do que na população geral, e que pacientes com mais de 65 anos consomem mais de a metade do orçamento do Ministério da Saúde e respondem por cerca de 60% dos dias de UTI (8). Nos Estados Unidos aproximadamente 750.000 pessoas desenvolvem sepsis anualmente e destas, mais de 210.000 evoluem para o óbito (8).

Na última década, ocorreram importantes avanços no entendimento da fisiopatologia desta síndrome. Ainda que estudos multicêntricos tenham identificado intervenções benéficas no manejo da sepsis, como a manutenção adequada dos parâmetros hemodinâmicos e o uso precoce da antibioterapia, a sua elevada mortalidade torna essencial a busca de novas alternativas de tratamento (5). Neste sentido, um novo alvo potencial na terapêutica da sepsis experimental no rato, a via de sinalização mediada pela bombesina fator de liberação da gastrina, será o objeto desta tese.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Fisiopatologia da sepse

Sepse ocorre por estímulo excessivo de mediadores pró-inflamatórios ou em reação à resposta sistêmica inflamatória a uma variedade de estímulos infecciosos e não infecciosos. O entendimento dos principais eventos pró e anti-inflamatórios que induzem a danos teciduais é, sem dúvida, o primeiro passo na tentativa de melhorar o prognóstico da sepse e estabelecer a sua terapêutica adequada (1, 2, 3, 6, 7).

A maioria dos pesquisadores concordam que melhores taxas de sobrevivência em pacientes com sepse grave só poderão ser atingidas com terapias adicionais às terapias antimicrobianas convencionais.

A intervenção em qualquer passo da seqüência dos eventos fisiopatológicos que caracterizam a resposta inflamatória sistêmica da sepse, no sentido de modificar (modular) essa reação do hospedeiro, parece ser a estratégia terapêutica com maiores perspectivas de mudar os resultados desalentadores da terapia da sepse. Infelizmente, o uso clínico de terapias bloqueadoras de mediadores individuais têm falhado em reduzir a mortalidade geral associada a sepse (5).

Mais de 30 estudos cegos randomizados envolvendo 12.000 pacientes mostraram que o uso de anticorpos bloqueadores (antifator de ativação

plaquetária, antiprostaglandina, anticorpo monoclonal anti-TNF, antagonista do receptor IL-1, receptor solúvel TNF, inibidor da sintetase do óxido nítrico) não mudou o curso clínico ou a mortalidade de pacientes com sepse, e algumas vezes, até os prejudicou (5, 8).

Os agentes que ligam ou que neutralizam os componentes da parede celular bacteriana (anticorpos antiendotoxina, antiproteína de ligação de lipopolissacarídeos, anti-receptores CD14, antiproteína de aumento da permeabilidade) ou aqueles que modulam a resposta imediata do hospedeiro a esses produtos tóxicos (pentoxifilina, amrinona) não se mostraram válidos para o tratamento da sepse. Em um estudo recente que utilizou anticorpo monoclonal humano para um antígeno comum às enterobactérias, falhou em demonstrar a redução da mortalidade (5, 9, 10).

A pentoxifilina, da mesma forma que a amrinona, inibe a fosfodiesterase, aumentando as concentrações de AMP-cíclico intracelular, resultando em redução no acúmulo de citocinas, especialmente TNF- α . Estudo europeu multicêntrico, duplo-cego, randomizado, com 100 recém-nascidos, demonstrou redução na mortalidade de prematuros com sepse no grupo que recebeu pentoxifilina, 5 mg/kg/h, por 6 horas, em 6 dias consecutivos (11).

Ainda que, em tese, sempre se tenha considerado os corticosteróides como tendo alguma ação de bloqueio da síntese das citocinas, o seu uso e eficácia na sepse ou no choque séptico, não vinham sendo sustentados por evidências clínicas. Mais recentemente, houve um aumento no interesse por estudos que avaliem a utilidade dos corticóides, em baixas doses, na situação de sepse, devido

a observação de que a sepse pode estar associada à insuficiência adrenal relativa ou à resistência aos receptores glicocorticóides induzida pela inflamação sistêmica. Dois estudos randomizados, de Annane et al. e Keh e et al., respectivamente, indicaram que tanto o uso de doses fisiológicas de corticosteróides por 7 dias como o uso contínuo de baixas doses de hidrocortisona, foram benéficos nos pacientes em choque séptico. (5, 12, 13, 14).

Outros dois estudos multicêntricos, randomizados, duplo-cego e controlado por placebo; um com 1.879 pacientes de 105 hospitais dos EUA e Canadá e o outro com 498 pacientes de 44 hospitais dos EUA e Europa, que receberam anticorpos monoclonais anti-TNF- α , não demonstraram redução na mortalidade entre o grupo que recebeu o anticorpo e o grupo placebo (5, 15,16).

Os receptores antagonistas à IL-1 tenderiam a atenuar as alterações hemodinâmicas, reduzir a gravidade da acidose láctica e melhorar as taxas de sobrevivência. Porém, um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, com 696 pacientes de 91 hospitais dos EUA e Europa, não demonstrou reduzir a taxa de mortalidade com o uso de antagonista de receptor IL-1 humano recombinante, quando comparado com o uso de placebo (5, 17).

Outro potente mediador inflamatório é o fator de ativação plaquetária (PAF), um fosfolípido produzido pelos macrófagos, neutrófilos, plaquetas e células endoteliais, que pode mediar as ações de inúmeras citocinas. Existem indícios que o PAF esteja associado com os efeitos tóxicos do TNF- α e IL-1, ou seja, essas citocinas interagem com o PAF levando a um aumento da liberação de mediadores no choque séptico (5, 18). Assim, antagonistas de receptores de PAF

poderiam ser úteis na terapia da sepse por gram-negativos. Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, com 600 pacientes com sepse grave, que testaram antagonistas de receptores de PAF por quatro dias, não demonstrou qualquer redução na taxa de mortalidade (5, 18).

Sabe-se hoje que a produção de óxido nítrico (NO), é responsável por alguns dos efeitos nocivos da resposta inflamatória sobre os órgãos-alvo (vasodilatação e hipotensão, e depressão miocárdica no choque séptico). Ele é produzido a partir da L-arginina, com o auxílio da sintetase NO (Nos), sendo que a sua inibição ou bloqueio é uma das estratégias terapêuticas para minimizar esses efeitos. Embora a sua inibição em animais com sepse possa levar à normalização da pressão arterial, pode também determinar outros efeitos indesejáveis tais como, redução do índice cardíaco e aumento da pressão pulmonar. A utilização de inibidores da NOs não foi suficientemente testada em humanos como estratégia terapêutica (5, 8).

Os metabólitos do ácido araquidônico são produtos da via da lipoxigenase e cicloxigenase. Possuem potente efeito vasoregulador, influenciam a redução da resistência vascular sistêmica e a hipotensão que ocorre no choque. Vários inibidores da cicloxigenase (indometacina, ibuprofeno) parecem ter efeito benéfico em pontos específicos da cascata inflamatória e na sobrevivência de animais. Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com o uso do ibuprofeno em 455 pacientes com sepse, mostrou redução nos níveis de prostaciclina e tromboxane, redução na febre, taquicardia, acidose láctica e consumo de oxigênio, e, no entanto, não preveniu o desenvolvimento de choque ou de síndrome da angústia respiratória, nem melhorou a sobrevivência dos pacientes.

Estudo de uma meta-análise de 18 estudos clínicos de fase II e III, sobre o uso de agentes não-esteróides com propósito antiinflamatório para o tratamento da sepse, baseado em 6.429 pacientes, demonstrou haver apenas tendências de benefício para esses pacientes, sem contudo alterar a taxa de mortalidade (5, 12).

Também o metabolismo do oxigênio está comprometido na sepse. A reperfusão ou a reoxigenação causam aumento da produção de radicais livres e está associada à dano tecidual. Estudos de sepse em modelos animais já mostraram efeitos benéficos de tratamento com varredores de radicais livre de oxigênio (superóxido-dismutase e catalase). Outras terapias com agentes antioxidantes (α -tocoferol, dimetil-sulfoxide, coenzima Q10, N-acetilcisteína, glutathione, alopurinol, entre outras) estão em avaliação através de estudos em animais, com resultados ainda inconclusivos (5, 8).

A interpretação dos resultados dos estudos conduzidos com agentes que bloqueiam a resposta inflamatória são difíceis devido a heterogeneidade dos pacientes e a alta taxa de sepse sem um agente causal determinado. A teoria de que a morte decorrente da sepse é atribuída a uma hiper estimulação do sistema imunológico foi baseada em estudos em animais e parece não corresponder exatamente ao quadro clínico observado em humanos. Estes estudos em modelos animais tendem a utilizar altas doses de endotoxinas ou bactérias. Conseqüentemente, os níveis de citocinas circulantes, bem como de fator de necrose tumoral (TNF- α), estão muito mais elevados em animais do que em pacientes com sepse. Nestes estudos, os animais costumam ir ao óbito por "cytokine storm". Além disto, há observações de compostos e macromoléculas que bloqueiam estes mediadores, melhorando a sobrevivência dos animais (1, 2, 3).

Da mesma, os avanços no entendimento das vias de sinalização celular da resposta a patógenos tem demonstrado que o conceito de bloquear as endotoxinas, com o objetivo de prevenir as complicações da sepse, são simplistas. Células do sistema imune inato reconhecem microorganismos e iniciam sua resposta através dos chamados receptores “toll-like” (TLRs). Esclarecimentos sobre o papel dos TLRs no combate a infecção tem sido demonstrados por estudos em ratos C3H/HeJ, os quais são resistentes às endotoxinas devido a mutação no receptor “toll-like” 4 (TLR4). Apesar de sua resistência às endotoxinas, estes ratos tem mortalidade aumentada na sepse. Mutações no TLR4 tem sido identificadas em humanos e podem tornar os indivíduos mais susceptíveis a infecção. Portanto, embora as endotoxinas apresentem um efeito deletério no quadro da sepse, o seu bloqueio completo pode ser deletério. Neste sentido, a falha em estudos com anticorpos monoclonais anti-endotoxinas na sepse deve ser interpretada com maior cuidado, merecendo estudos mais aprofundados (1, 2, 22, 23).

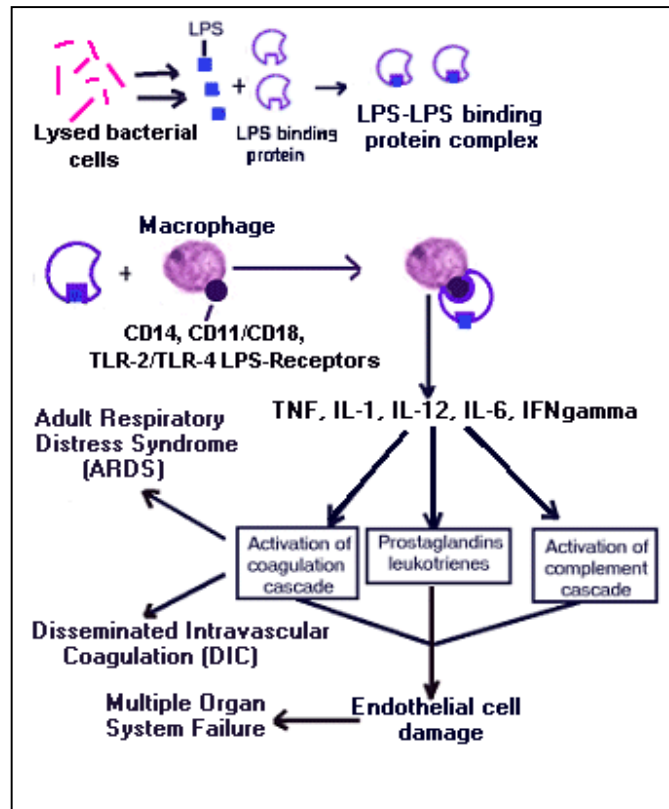


Figura 1:

2. Fatores genéticos do hospedeiro

Com base em estudos com gêmeos idênticos, os fatores genéticos são conhecidos por serem os maiores determinantes na susceptibilidade de morte decorrente da infecção. Algumas pessoas apresentam alterações pontuais em genes que controlam a resposta do hospedeiro ao patógeno (2, 30, 31). As alterações identificadas incluem polimorfismos nos receptores TNF, receptores interleucina-1, receptores $Fc\gamma$ e TLRs (2, 30,31). Polimorfismos no gene das citocinas podem determinar os níveis de concentração de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias produzidas e modular uma resposta hiperinflamatória ou hipoinflamatória à infecção. O risco de morte entre pacientes com sepse tem sido relacionadas a polimorfismos genéticos do TNF- α e TNF- β (2,

30). Estudos examinando o efeito dos polimorfismos em pacientes com pneumonia e sepse estão em andamento. Tais polimorfismos poderão ser usados para identificar pacientes com alto risco para o desenvolvimento de sepse e falência de múltiplos órgãos durante a infecção. Desta forma, no futuro, será possível utilizar a informação genética para estabelecer uma terapia específica de base imunológica para modular a resposta de um determinado paciente.

3. Modelo animal de sepse:

Estudos de sepse em humanos são difíceis, devido à severidade da doença, à necessidade de intervenções terapêuticas imediatas e à heterogeneidade dos pacientes. Assim, modelos animais têm sido usados extensivamente para explorar a patogênese e gerar dados pré-clínicos que dêem suporte a intervenções terapêuticas.

Neste contexto, deve-se buscar um modelo animal que reproduza as principais características observadas na sepse em humanos, incluindo a vasodilatação, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade observados em pacientes sépticos. Tem-se utilizado para isto modelos de sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) ou por fator de necrose tumoral. Os modelos que induzem peritonite, entretanto, são mais amplamente usados. A peritonite pode ser induzida por inoculação direta de bactérias ou de conteúdo fecal na cavidade peritoneal.

Dentre estes, o modelo mais utilizado na literatura, e que parece simular mais adequadamente o quadro clínico de sepse, é o da ligação cecal e perfuração (CLP). A CLP se baseia na ligação do ceco, logo abaixo da válvula ileo-cecal (mantendo, desta maneira, o trânsito intestinal), perfuração do ceco com tamanho padronizado e liberação de conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, conforme classicamente descrito por Wichterman et al. (1980) (32). Desta maneira, além da peritonite, ocorre isquemia mesentérica, simulando as grandes síndromes clínicas de sepse abdominal (p. e., apendicite ou isquemia mesentérica). Recentemente, este modelo foi modificado para melhor simular as características clínicas dos pacientes com sepse abdominal, introduzindo desta maneira a ressuscitação volêmica e emprego de antibióticos de amplo espectro (33).

4. O papel das espécies ativas de oxigênio na fisiopatologia da sepse:

Diversos mecanismos de inflamação e dano celular são implicados na fisiopatologia da sepse, choque séptico e disfunção orgânica relacionada à sepse, entre eles a geração de espécies ativas do oxigênio (EAO) (4, 23, 24). As propriedades pró-inflamatórias dos EAO incluem dano às células endoteliais, formação de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, oxidação e peroxidação de lipídeos, dano ao DNA, liberação de TNF α e IL-1 e formação de peroxinitrito (4, 23). A hiperprodução de EAO e a falha nos mecanismos de proteção naturais contra estes insultos são implicados no dano endotelial, alterações miocárdicas e falência orgânica múltipla.

Os monócitos e polimorfonucleares sofrem alterações, descritas como ativação de leucócitos, em resposta a estimulação por TNF e interleucinas (IL), com um conseqüente aumento na produção de superóxido (O_2^-) por estas células. Primariamente, o superóxido (O_2^-) tem um efeito pró-inflamatório, que é perpetuado pela formação de peroxinitrito (reação de superóxido com óxido nítrico). O peroxinitrito possui vários efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios independentes que levam ao dano celular irreversível, como evidenciado no choque séptico.

O choque séptico é caracterizado por severa hipotensão e diminuição da perfusão tecidual em decorrência da hiporreatividade vascular a catecolaminas endógenas e exógenas, o que, pelo menos em parte, é explicado pelo grande aumento na produção de óxido nítrico que ocorre na sepse. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de ser considerado um oxidante estável, conta com um papel importante na fisiopatologia da sepse. O H_2O_2 pode ser metabolizado por duas enzimas antioxidantes, a glutathiona peroxidase e a catalase, mas em presença de metais de transição, ele é decomposto em radical hidroxila, via reação de Fenton, um radical altamente tóxico e reativo. O dano às células musculares e acidose aumentam a quantidade de ferro liberado da mioglobina e hemoglobina, facilitando esta reação. Recentemente, foi demonstrado que alterações do metabolismo de ferro podem estar relacionados com mortalidade em modelos animais de sepse (34).

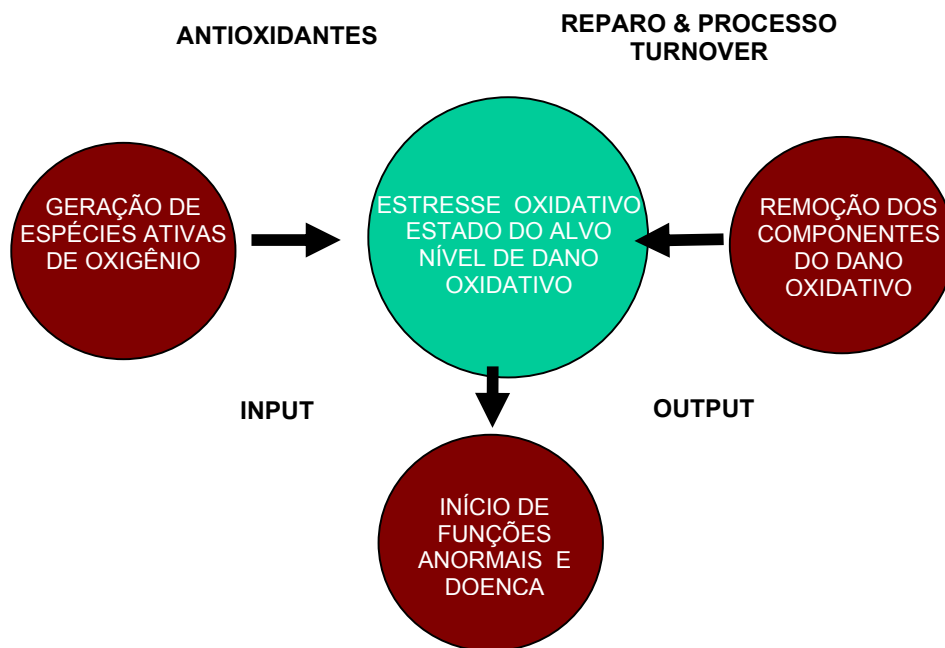


Figura 2:

5. Antioxidantes e tratamento de sepse

Intervenções que reduzem a produção das EAO exercem efeitos benéficos em diversos modelos de endotoxemia e choque séptico (35). Estas intervenções incluem o uso de N-acetilcisteína (NAC) (36, 37, 38), α -tocoferol (39), alopurinol (38), deferoxamina (DFX) (40), catalase (41), superóxido dismutase (41), miméticos de superóxido dismutase (42), magnolol (43) e tempol (44). Geralmente estas intervenções são administradas antes ou imediatamente após a indução da sepse o que pode limitar sua relevância clínica.

Entre os antioxidantes mais estudados no tratamento da sepse, a NAC é bem conhecida. Esta é uma precursora artificial de glutatona e utilizada clinicamente como droga mucolítica e no tratamento da intoxicação por paracetamol, com raros efeitos adversos. NAC é um sequestrador de peróxido de

hidrogênio, ácido hipoclorídico e radical hidroxil, e por estas ações, inibe a liberação de $\text{TNF}\alpha$, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e a apoptose.

Evidências sugerem que a expressão do gene TNF é controlada pela transcrição do fator nuclear $\text{NF-}\kappa\text{B}$, cuja a atividade pode ser induzida pelo peróxido de hidrogênio. NAC mostrou inibir a atividade do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ em várias linhagens celulares, inclusive em macrófagos peritoneais de ratos. O peróxido de hidrogênio, diretamente ou indiretamente através de sua redução a radical hidroxil via reação de Fenton, age como um mensageiro na síntese e ativação de mediadores inflamatórios. NAC como seqüestradores destes radicais mostrou inibir a liberação destes mediadores.

Por estas razões, é reconhecido o papel antioxidante da NAC na sepse, mas quando utilizada antes da indução da sepse e não depois (45, 46). Em contraste, alguns estudos demonstram um aumento no estresse oxidativo e mortalidade por sepse após uso de altas doses da NAC, possivelmente relacionado a sua capacidade para reduzir o ferro para sua forma cataliticamente ativa (37), favorecendo a reação de Fenton.

Deferoxamina (DFX) é um quelante de ferro empregado com segurança no tratamento de várias doenças hematológicas. Experimentalmente, já foi citada em alguns estudos como uma droga que diminuiu a injúria oxidativa, quando usada antes e não depois da indução da sepse, melhorando a mortalidade em um modelo animal de sepse abdominal (39).

6. O RC-3095

6.1. Generalidades

A Bombesina é um peptídeo primeiramente isolado por Anastasi et all. a partir da pele de sapos *Bombina bombina* em 1971 (47). Estudos imunquímicos mostraram a presença da Bombesina (imunoreatividade) no Sistema Nervoso Central (SNC) e trato gastrointestinal (TGI) em várias espécies, incluindo ratos, porcos, cachorros e humanos. Um análogo mamífero da bombesina, com potente atividade liberadora de gastrina, o peptídeo liberador de gastrina (GRP), foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos por McDonald et all. (48). O GRP, sigla em inglês de gastrin releasing peptide, e a bombesina têm em comum nove de dez aminoácidos C-terminais. Contudo esta imunoreatividade, não é devida somente a Bombesina, como também aos peptídeos relacionados: peptídeo gastrina-relacionado (GRP), decapeptídeo neuromedina-B (NMB) e neuromedina C (NMC). Todos esses peptídeos fazem parte da família Bombesina-relacionados (BNPs).

O GRP apresenta várias atividades biológicas, incluindo habilidade de suprimir a ingestão de alimentos. A introdução exógena de bombesina gera muitas respostas, incluindo a regulação da secreção exócrina e endócrina pelo trato gastrointestinal, contração da musculatura lisa, nutrição, pressão arterial, glicemia, temperatura corporal e crescimento celular. A bombesina é biologicamente ativa no SNC, onde tem ação neuromoduladora, e também tem um papel importante como modulador do pâncreas exócrino. NMB e GP mediam uma variedade de ações periféricas e centrais, tanto quanto o

crescimento autócrino, saciedade, termoregulação, estresse e ansiedade/ depressão correspondendo pela ação desses peptídeos em receptores referidos.

6.2. Peptídeos semelhantes a Bombesina (BNPs) como Fatores de Crescimento Tumoral

Os BNPs de mamífero também podem agir como mitógenos, alterando a proliferação de células normais e malignas, como mostrado no carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC), no carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) (49), e nas células de Swiss 3T3 in vitro (50, 51, 52). Em vários cânceres humanos, como CPPC, pancreático, prostáticos e gástricos, os BNPs parecem estimular crescimento e funcionar como fatores de crescimento autocrinos (50, 52, 53).

Os BNPs estão envolvidos no desenvolvimento pulmonar embrionário (54, 55) Os efeitos inibitórios no crescimento tumoral de anticorpos monoclonais 2A11 de murinos é revertido pela adição de bombesina exógena, demonstrando que os BNPs podem funcionar como fator de crescimento autócrino em células de CPPC humanas (51,53,59). O anticorpo monoclonal de murino 2A11 também foi testado em pacientes com CPPC. Foi demonstrado atividade de anti-CPPC (56). Esta tentativa resultou em um paciente com uma resposta completa e quatro pacientes com doença estável entre 12 pacientes avaliados. Não surpreendente, a frequência de regressão tumoral nos pacientes é menor que a frequência de

inibição do crescimento in vitro observada nas células de CPPC. Este achado pode ser devido a uma maior dependência das células de CPPC em cultura a um controle autócrino da bombesina. Recentemente outros fatores autócrinos de NMB também foram descritos em CPPC (57, 58). Outro estudo também demonstrou que os tumores de pequenas células pulmonares (CPPC) expressam fatores de crescimento semelhantes à Bombesina por via autócrina (59).

6.3. Efeito antitumoral dos antagonistas dos peptídeos tipo bombesina

O efeito anti-tumoral de alguns análogos de peptídeo hormonais depende da presença dos receptores específicos nas células tumorais (60). A identificação de padrões de expressão destes receptores é essencial para a aferição da eficácia de tratamentos baseado nos antagonistas da BN/GRP e receptores de BN/GRP. Foram demonstrados receptores específicos para BN/GRP em vários tipos de câncer de humanos: ovário, (61, 62), CPPC (63, 64) , CPNPC (65, 66) .

Um estudo de expressão de mRNA para três tipos de receptores de BN/GRP em câncer de epitelial de ovário humano indica que esses receptores são amplamente distribuídos nesses tumores. O receptor BRS-3 é um achado comum em tumores ovarianos estágio IV (63). Esta alta incidência de BRS-3 expressando RNAm nos estádios IV sugerem que BRS-3 possa ter um papel importante nas metástases deste câncer.

Outros estudos mostraram a relação dos BNPs com o crescimento autócrino de CPPC humanos (51, 53, 59, 67-69) e CPNPC (69). Essa relação

também foi documentada como tendo um papel central na patogênese de neoplasias pancreáticas, prostáticas, mama e glioblastomas malignos (61, 70-75). Estes resultados incentivaram pesquisadores da área a projetar e sintetizar antagonistas específicos de BN/GRP na esperança de uma abordagem hormonal mais efetivas no tratamento desses tumores no qual o crescimento pode ser estimulado pela Bombesina (62, 76-79).

Além da ação autócrina (estimulação mitogênica próximo as células tumorais) bem documentada dos BNPs, eles também estão implicados na progressão de vários tumores como o CPPC (53, 59, 69, 81-83), pancreático, gástrico, mama, tanto *in vivo* como *in vitro* (60, 76, 83, 84). A linhagem celular do tumor pancreático humano produz GRP e seu receptor específico (85) que sugere uma auto-estimulação.

Estes resultados sugerem que os antagonistas de BN/GRP podem inibir crescimento tumoral através da ligação em receptores de BN/GPR específicos. O papel de autócrino do GRP no CPPC estimulou progresso significativo no desenvolvimento de antagonistas do GRP (79). O receptor local que liga-se na região situada no 8º aminoácido C-terminal do GRP onde é estruturalmente idêntico com a região homóloga da BN.

Foram desenvolvidos vários antagonistas de BN/GRP para uma possível aplicação clínica no tratamento dessas neoplasias (60, 86-94). A modificação da ponte peptídica C-terminal (situado entre resíduos 13 e 14) para uma forma reduzida (o CH₂-NH) resulta em um antagonista da BN muito potente (76, 77, 80, 87). A incorporação de um D-aminoácido a cadeia curta N-términal

[pseudononapeptídeo BN-(6-14) análogos] gera uma potência inibitória adicional (88). Outros antagonistas foram desenvolvidos substituindo terminal Met-NH₂ com um éster alquila (88) ou um amido alquila (95,96). Usando modelos experimentais de diferentes tipos de câncer *in vivo* e em ratos “nus” com xenoenxertos de células de câncer humano, foram achados vários antagonistas da BN que inibiram o crescimento de tumores da próstata, ovário, pulmão, pâncreas, gástricos, e melanoma maligno (82, 82-84, 97-108).

Com base nas observações acima, podemos dizer que esses fatores são importantes na estimulação da proliferação em vários modelos tumorais de ratos e humanos, em especial no câncer pulmonar de pequenas células. Schally et al. sintetizaram uma série de antagonistas da bombesina com finalidade terapêutica contra o câncer. Os antagonistas da bombesina constituem uma nova abordagem experimental no tratamento do câncer cujo objetivo é a interferência em mecanismos de estimulação autócrina e/ou parácrina críticos para a manutenção da atividade proliferativa de vários tumores humanos (79).

6.4. A escolha do RC-3095 como um protótipo dos antagonistas sintéticos da Bombesina

Até o presente, dentre os antagonistas da bombesina, o RC-3095 mostrou ser o de maior potência (83, 84, 87, 91-93, 109, 110). Ele é membro da família de pseudononapeptídeo BN/GRP (figura 3). RC-3095 exerce potente

atividade inibitória em uma ampla variedade de neoplasias humanas que incluem linhagem MCF-7 MIII de câncer mama [80], câncer mama MTX estrógeno dependente e estrógeno independente em ratos (108), câncer pancreático induzido por nitrosaminas em “hamsters” (108, 112), câncer prostático androgênio independente R-3327-AT-1 em ratos (103), câncer de cólon HT-29 (94), câncer prostático PC-3, PC-82 e DU-145 (113, 114, 115), câncer pancreático humano CFPAC-1 E SW-19990 (83, 102, 116), linhagem celular humana de câncer gástrico MKN-45 e Hs-746 (84,102).

6.5. Receptores do tipo Bombesina e os receptores do EGF

O fator de crescimento epidérmico, em inglês – “epidermal growth factor” (EGF) – é um agente promotor de crescimento que se liga com alta afinidade ao seu receptor transmembrana específico (EGF-R) (100). Uma vez ativado o receptor, há transmissão de sinais mitogênicos para o núcleo celular através da fosforilação de resíduos próprios de tirosina e, posteriormente de proteínas intracelulares (117). A BN/GRP produz aumento na expressão de receptores de EGF e aumentam a fosforilação dos mesmos substratos (118). BN/GRP hiper-regula a ligação do EGF (119, 120) e sinaliza o seu estímulo de crescimento parcialmente através da amplificação do sistema tirosina-cinase EGF-R (118).

O EGF e seu receptor são moléculas relacionadas na carcinogênese. A expressão excessiva de EGF-R é sinal de comportamento biológico mais agressivo de alguns tipos de câncer (121,122). Em muitos modelos experimentais

de neoplasia, o tratamento com antagonistas da BN/GRP produzem redução dos EGF-Rs e concomitante inibição do crescimento tumoral (61, 103, 106-108, 111, 115, 116, 123). O envolvimento de fatores de crescimento como o EGF, assim como o fator de crescimento tipo-insulina I e II (IGF-I e IGF-II) e a bombesina já foram muito estudados em câncer pulmonar (53, 59, 69, 124-128). Parece que o efeito inibitório dos antagonistas da BN/GRP é mediado pela interferência no mecanismo EGF-R. O RC-3095 diminui a ligação do EGF com seu receptor e antagoniza os efeitos estimulatórios da BN/GRP e do EGF em tumores prostáticos, pancreáticos e de mama (107,108,112).

O efeito antitumoral do RC-3095 em CPPC linhagem celular H-69 dá-se diretamente por redução dos níveis de expressão intracelular do EGF-R RNAmensageiro (RNAm) (98). Halmos et al. relataram, em xenotransplantes de camundongos com linhagens celular H-128 de CPPC humano, tratados com RC-3095, uma redução significativa de volume tumoral e redução dos níveis de EGF-R RNAm (116). Esses resultados estão de concordantes com outros relatos em câncer pancreático, gástrico, prostático e pulmonar, nos quais a inibição da proliferação celular pelos antagonistas BN/GRP foi acompanhada por uma marcada redução da expressão de BN/GRP e EGF (82-84, 101, 102, 107, 108, 114, 116, 118, 129, 130). Embora o mecanismo de ação completo da ação do RC-3095 ainda é incerto, o efeito antitumoral deve ser resultante da inibição de receptores EGF, os quais diminuem a autofosforilação do EGF-R (116, 118).

6.6. RC-3095 e sua aplicação clínica

Estudos de toxicidade em animais falharam em identificar uma dose tóxica potencial para esse agente. A dose inicial do RC-3095 para estudo clínico de fase I foi, portanto, baseada nas doses usadas em animais, doses essas seguras e com atividade antitumoral, observadas em vários modelos experimentais de animais com vários tipos de câncer (131). Nosso grupo conduziu o primeiro e único estudo de fase I com o RC-3095. Esse estudo foi totalmente realizado em nossa instituição e contou com 25 pacientes.

Os pacientes tinham como característica serem portadores de tumores sólidos refratários a tratamentos convencionais. Destes, 13 eram do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com mediana de idade de 59 anos (variação de 32-80 anos). A mediana do estado de desempenho da OMS foi 1 (variação de 0-2). Os tipos de tumores foram 14 adenocarcinomas – 2 de cólon, 3 de rim, 2 de pâncreas, 1 de ovário e 6 de próstata; 3 carcinomas ductais invasivos de mama, 1 CPPC, 2 CPC, 1 carcinoma de estômago, 1 carcinoma epidermóide (esôfago), 1 adenocarcinoma medular (tireóide) e 2 sarcomas de partes moles (131).

Foram realizados um total de 80 ciclos, com uma mediana de 3 ciclos por paciente (variação de 1-5). O RC-3095 foi administrado em grupos consecutivos de pacientes em bolo único através de injeções subcutâneas em 3 diferentes níveis de dose (8 μ g/kg de peso, 16 μ g/kg de peso e 32 μ g/kg de peso). Uma emenda ao protocolo foi realizada a partir desse nível de dose devida à total ausência de toxicidade nos níveis I, II e III. A partir desse ponto, o RC-3095 foi escalonado através da administração do agente 2 vezes ao dia nos níveis de dose

IV e V. Essa escalonagem foi proposta após a observação em laboratório de que a interação desta droga com receptores bombesina-similares é mais favorável com essa sistemática, em vários modelos de tumores, em termos de inibição do efeito estimulatório de crescimento autócrino, quando administrado mais freqüentemente em camundongos com tumores transplantados (109) .

Assim, os níveis de dose IV e V foram de 32 μ g/kg e 48 μ g/kg administrados em 2 doses diárias, respectivamente. Cada ciclo do RC-3095 foi administrado diariamente por 21 dias consecutivos (109). Foram incluídos 3 pacientes nos níveis de dose I a V. Devido a não observação de efeitos tóxicos no nível de dose V, procedemos o escalonamento de dose para o nível VI, ou seja, 96 μ g/kg, 2 vezes ao dia, com a inclusão de mais 10 pacientes.

Apesar do objetivo principal de um estudo fase I seja avaliar uma dose adequada, com mínima toxicidade para poder ser aplicada em estudos fase II, foi observada uma regressão menor em uma paciente com carcinoma medular de tireóide que foi tratada no nível III de dose. Essa paciente, uma mulher de 72 anos, desenvolveu metástases pulmonares e hepáticas múltiplas e não respondeu ao tratamento com Interferon-alfa e análogos da Somatostatina. Apresentou ainda uma redução de cerca de 30% no produto do diâmetro das lesões mensuráveis em ambos os pulmões e fígado. Concomitantemente, houve uma marcada melhora da dispnéia cerca de 4 semanas após o início do tratamento. A duração da resposta foi de 12 semanas. Infelizmente, houve posterior progressão da doença no fígado e o tratamento foi interrompido. Os demais pacientes evoluíram com progressão clínica da doença após 1-2 ciclo de tratamento (109).

6.7. Formulação do RC-3095

O antagonista da Bombesina RC-3095 foi sintetizado através de uma técnica de fase sólida da resina benzidrilamina no laboratório de Schally (Universidade de Tulane, New Orleans). (118). A estrutura desse pseudonpeptídeo antagonista da Bombesina é mostrada na Figura 3. 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 introduzido no nonapeptídeo Leu 13 ψ (Ch₂-NH) Leu 14-Bombesina. A redução da ligação peptídea entre a posição 13 e 14 foi introduzida utilizando-se uma reação de alquilação redutiva (59). O antagonista da Bombesina foi sintetizado como dois diferentes sais: D-21663 é um sal trifluor-acetato e D-22213 é um sal acetato (109).

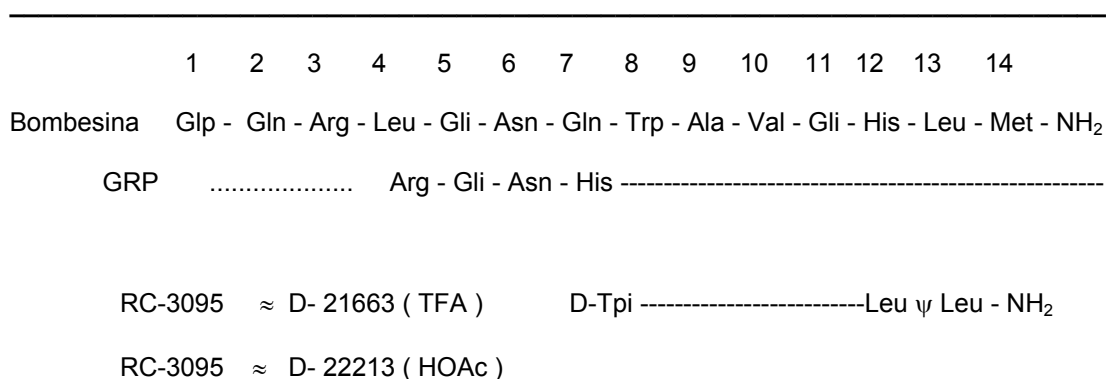


Figura 3: Estrutura do RC-3095 [17]

6.8 Origem da Droga RC-3095

A droga RC-3095 foi fornecida pela indústria ZENTARES (subdivisão da antiga ASTA Médica, Alemanha), exclusivamente para o desenvolvimento deste estudo clínico.

6.9 Estudos de Toxicidade

6.9.1 Em cães Beagle

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratórios, Alemanha), realizou-se um estudo de toxicidade do RC-3095 através da administração subcutânea por duas semanas em cães da raça Beagle. O objetivo era obter informação sobre o perfil toxicológico da substância após a administração repetida, diária e subcutânea em não-roedores. Três grupos com dose diferentes (grupos 2-4) e um grupo-controle (grupo 1) foram estudados. Cada grupo era composto de três machos e três fêmeas.

O RC-3095 foi administrado como uma solução aquosa em manitol (0,3 molar) nos grupos 2, 3 e 4 em um volume constante de injeção de 1 ml/Kg de peso. Os cães do grupo 1 receberam uma solução de manitol de 1 ml/Kg de peso (0,3 molar). A variação da dose foi de 0,316 mg/Kg de peso como limite inferior (grupo 2), 0,562 mg/Kg de peso como dose média (grupo 3) e 1 mg/Kg de peso como limite superior (grupo 4).

O comportamento e as condições gerais dos cães não foram alterados durante o período de tratamento. Contudo, os animais mostraram sinais de intolerância nos locais das injeções. Isto ocorreu com a dose máxima em um macho (N° 19) e em uma fêmea (N° 22) do grupo 4 na segunda semana e em duas fêmeas do grupo 3 (N° 16, 17), com dose média, na segunda semana. Os locais das injeções subcutâneas estavam moderadamente edemaciados devido às propriedades irritantes da substância testada. Nenhum outra evidência clínica foi observada nos grupos tratados ou no grupo-controle, e nenhuma morte ocorreu durante o período de tratamento.

O hábito alimentar dos cães não foi influenciado significativamente durante o estudo, o mesmo ocorrendo com o ganho ponderal dos animais. Outros aspectos clínicos examinados, como reflexos, condições oftalmológicas e auditivas, dentes, temperatura corporal e frequência cardíaca, também não sofreram alterações.

Tanto os parâmetros de análise hematológica quanto os exames bioquímicos e os de urina não revelaram alterações relacionados ao tratamento. O exame macroscópico não revelou qualquer achado relacionado ao tratamento, com exceção daqueles encontrados nos locais das injeções. Estes mostravam áreas avermelhadas e estavam espessados nos animais tratados. Os casos mais graves eram os dos animais do grupo da maior dose. As fêmeas do grupo 4 de maior dose revelaram uma redução estatisticamente significativa do peso do trato genital tanto absoluto quanto relativo.

O exame macroscópico não mostrou qualquer achado sistêmico relacionado ao tratamento. Os locais das injeções evidenciaram uma incidência aumentada de infiltrados inflamatórios, necrose focal e fibrose, cuja gravidade estava relacionada à dose administrada. Nos animais controle, existiam apenas achados mínimos com alguma hemorragia focal, fibrose/fibroplasia e inflamação, evidências que refletem o caráter traumatizante da administração parenteral.

Os animais dos grupos 2 a 4 também demonstraram infiltrados inflamatórios relacionados à dose administrada. Esses infiltrados variavam, por suas características, de agudos a crônicos. Nos grupos 3 e 4, a inflamação crônica tinha um caráter granulomatoso focal e estava presente ao redor de material eosinofílico (presumivelmente material testado). A lesão aguda apresentava áreas centrais com necrose. Esses achados correlacionavam-se com os achados macroscópicos das áreas espessadas. Todos os outros achados foram considerados como não sendo relacionados ao tratamento e interpretados como lesões comuns observadas em cães jovens da raça Beagle.

Concluiu-se como resultado deste estudo de toxicidade de duas semanas com injeções subcutâneas diárias e repetidas do RC-3095 e cães Beagle, observando-se que o teste da substância não induziu toxicidade específica em uma dose que variou de 0,316 e 1,000 mg/Kg por quilo de peso. Isto ocorreu tanto na avaliação clínica quanto nos exames clínico-patológicos, inclusive na análise urinária. Os exames macro e microscópicos não revelaram qualquer toxicidade aos órgãos-alvo.

6.9.2. Em ratos Wistar

Nos laboratórios de Schally (Toxicology Report: data on file; Asta Laboratories, Alemanha), realizou-se um estudo de toxicidade durante quatro semanas com administração diária subcutânea de RC-3095 em ratos Wistar. Tal estudo foi executado com vistas à obtenção de informação sobre o perfil de toxicidade do RC-3095 após administração diária repetida e ao registro do nível do efeito tóxico não-observável.

A rota de administração subcutânea foi escolhida por ser a mais plausível de aplicação em seres humanos. Quatro grupos de ratos Wistar foram usados no estudo, todos constituídos de 10 machos e 10 fêmeas. Cinco animais adicionais por sexo foram usados exclusivamente para amostragem de sangue nos grupos 1, 2 e 4 para identificar o perfil toxicocinético da substância testada. O RC-3095 foi administrado em uma solução 0,3 molar de D-manitol nos animais dos grupos 2, 3 e 4. Os ratos do grupo 1 receberam solução de manitol a 0,3 molar como animais controle. A dose variou de 0,64 mg/Kg de peso como a menor dose (grupo 2), 1,00 mg/Kg de peso como dose intermediária (grupo 3) e 2,5 mg/Kg de peso como dose máxima (grupo 4).

Durante as quatro semanas de tratamento subcutâneo com RC-3095, não foram observados sintomas clínicos ou mortalidade. Nenhuma influência no consumo alimentar ou no peso corporal foi registrada. O teste de reflexos, o controle de audição, a dentição, os olhos e as investigações oftalmológicas não revelaram quaisquer alterações que pudessem ser atribuídas ao tratamento com o RC-3095. Da mesma forma, não houve alterações dos parâmetros

hematológicos nem influência nos parâmetros bioquímicos durante o estudo. Igualmente, não se observaram alterações toxicológicas relevantes na análise urinária que pudessem ser atribuídas ao tratamento.

O exame macroscópico revelou achados relacionados ao tratamento apenas nos locais das injeções em todos os grupos, incluindo os controles. Os locais das injeções apresentaram rubor focal, hemorragia ou eritema. Alguns animais tratados (grupos 3 e 4) também tenderam a apresentar um leve espessamento no local da injeção. Nenhuma mudança absoluta ou relativa de peso dos órgãos foi observada nos ratos em qualquer grupo.

Os achados microscópicos relacionados ao tratamento estavam presentes apenas nos locais da injeção. Todos os animais, incluindo os controles, tinham hemorragias focais de grau mínimo a moderado, fibrose/fibroplasia focal, necrose focal e infiltrados celulares inflamatórios agudos ou crônicos. Os animais tratados tenderam a apresentar uma gravidade desses achados relacionada à dose administrada, bem como a ocorrência de granulomas focais tipo corpo estranho ao redor de pequenos depósitos focais de um material eosinofílico amorfo (substância testada).

Portanto, durante o estudo de toxicidade de quatro semanas com administração subcutânea de RC-3095 em ratos Wistar, não se observou nenhum sintoma clínico relevante ou mortalidade. Os parâmetros patológicos clínicos e o peso dos órgãos também não foram influenciados pelo tratamento. Os achados relacionados ao tratamento estavam presentes exclusivamente nos locais das injeções. Estes ocorreram tanto nos animais tratados quanto nos controles. Tal fato reflete o caráter traumatizante de injeções subcutâneas repetidas. A extensão

e a gravidade desses achados foram limitados, o que se correlaciona bem com a excelente tolerância clínica do material testado.

Concluiu-se, com base no presente estudo de toxicidade em ratos Wistar, que o teste com a substância RC-3095 é bem tolerado no modelo proposto. A não-observância de efeitos tóxicos ocorreu nas doses mais altas de 2,5 mg/Kg de peso em administrações diárias repetidas. A aplicabilidade de doses mais elevadas ficou limitada pela baixa solubilidade aquosa do material testado no volume de administração máximo diário injetável.

6.10. Em Humanos

Como já mencionado, nosso grupo realizou o primeiro estudo clínico de fase I realizado em seres humanos com o RC-3095. Até o nível VI de dose, as únicas toxicidades observadas foram anemia, anorexia moderada e fadiga, provavelmente relacionada à doença de base. O único evento adverso relacionado ao uso do RC-3095 foi dor e/ou irritação no local da injeção. Nenhum caso de Toxicidade Dose-Limitante (TDL) foi documentado e a Dose Máxima Tolerada (DMT) não foi alcançada nos níveis de dose estudados (88, 115).

Não foi possível aumentarmos o nível de dose da droga por problemas de formulação da substância (88).

6.11. Justificativa

Diversos mediadores tem sido implicados na gênese e perpetuação de doenças inflamatórias agudas. Recentemente, alguns estudos publicados na literatura tem demonstrado o papel do peptídeo liberador de gastrina (GRP) na regulação da resposta imune. Estes peptídeos estão relacionados com a ativação de macrófagos alveolares (142), tendo participação na gênese da fibrose pulmonar idiopática (143,144). A administração intratraqueal de bombesina (um peptídeo semelhante ao GRP) induz resposta inflamatória em babuínos (145).

Tem-se demonstrado, também, o seu papel na fisiopatologia de doenças inflamatórias intestinais (146). A administração de bombesina diminui a infiltração neutrofílica e a hipomotilidade intestinal associada a lesão térmica (147) e melhora a lesão tecidual em modelo animal de colite (148). Além disto, os GRP estimulam a ativação da ciclooxygenase-2 em uma via dependente de AP-1 (149).

Portanto, as doenças inflamatórias agudas, especificamente hepatite severa aguda, síndrome da angustia respiratória aguda (SARA) e sepse podem ser alvo para o tratamento com inibidores de GRP, uma vez que a hiperfunção imune está associada a estas doenças. Até o presente, não há registro de nenhum estudo publicado na literatura abordando o papel desta via de

estimulação em doenças inflamatórias agudas ou a possibilidade de seu tratamento experimental com antagonistas destes peptídeos.

A grande morbidade e mortalidade relacionada a SARA, sepse e hepatite severa aguda, aliada ao seu grande custo financeiro e social, justifica a busca de novas estratégias de tratamento. Uma vez que existem evidências de que a via de estimulação sinalizada pelo GRP parece ter importância na fisiopatologia destas doenças, buscou-se neste projeto explorar os potenciais efeitos terapêuticos do RC 3095, um antagonista específico do GRP, em um modelo de sepse induzida em ratos disponível em nosso meio.

OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Objetivo Geral

Determinar o efeito da administração de RC-3095, um antagonista de receptores de bombesina/GRP, em modelo animal de doenças inflamatórias, especificamente sepse e lesão pulmonar aguda.

2. Objetivos Específicos

- a. Descrever os efeitos da administração do RC-3095 nas concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em culturas de macrófagos peritoneais do rato estimulados com endotoxina ou pela CLP em comparação com controle.
- b. Descrever os efeitos do RC-3095 em parâmetros relacionados ao dano oxidativo em tecidos de animais sépticos expostos ao RC-3095 em comparação com controle.
- c. Determinar os efeitos do RC-3095 em parâmetros plasmáticos indicativos de danos em órgãos-alvo em ratos sépticos.
- d. Determinar o efeito do RC-3095 em diferentes esquemas terapêuticos na sobrevivência em modelo animal de sepse.
- e. Determinar o efeito do RC-3095 no dano produzido por administração de LPS em modelo de injúria pulmonar aguda.

DESENHO DO ESTUDO

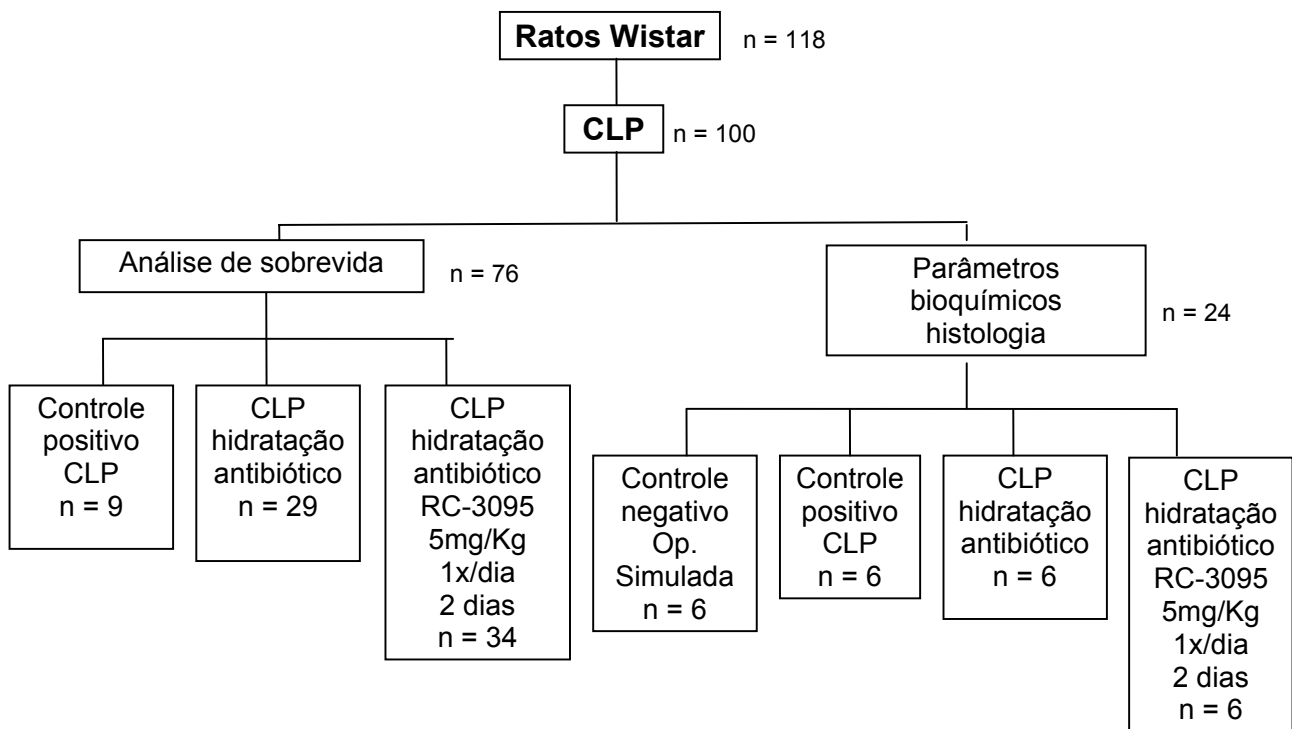
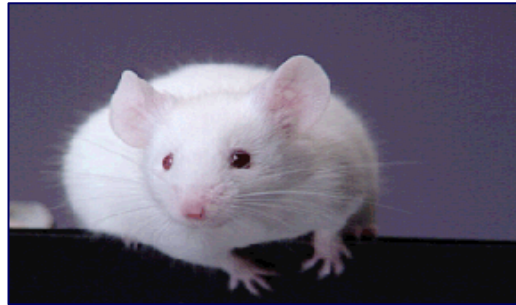
EXPERIMENTAÇÃO *in vivo*:

Ratos Wistar

n = 118

Grupo I : CLP (n = 100)

Grupo II: ALI (n = 18)

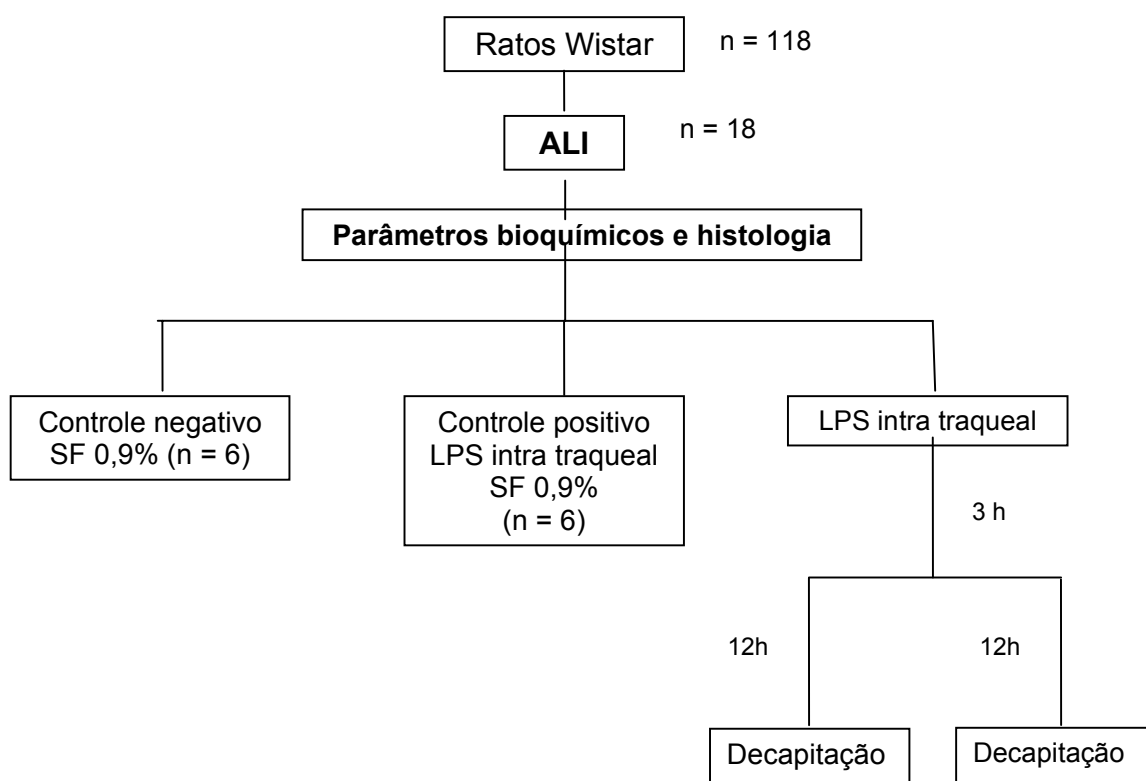
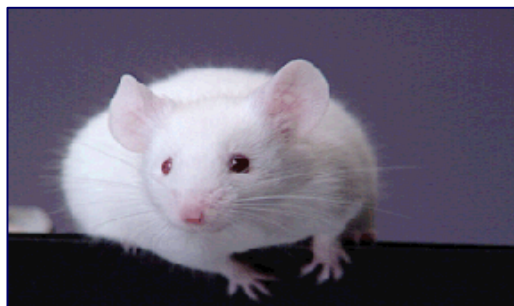


EXPERIMENTAÇÃO *in vivo*:

Ratos Wistar

n = 118

Grupo II: ALI (n = 18)

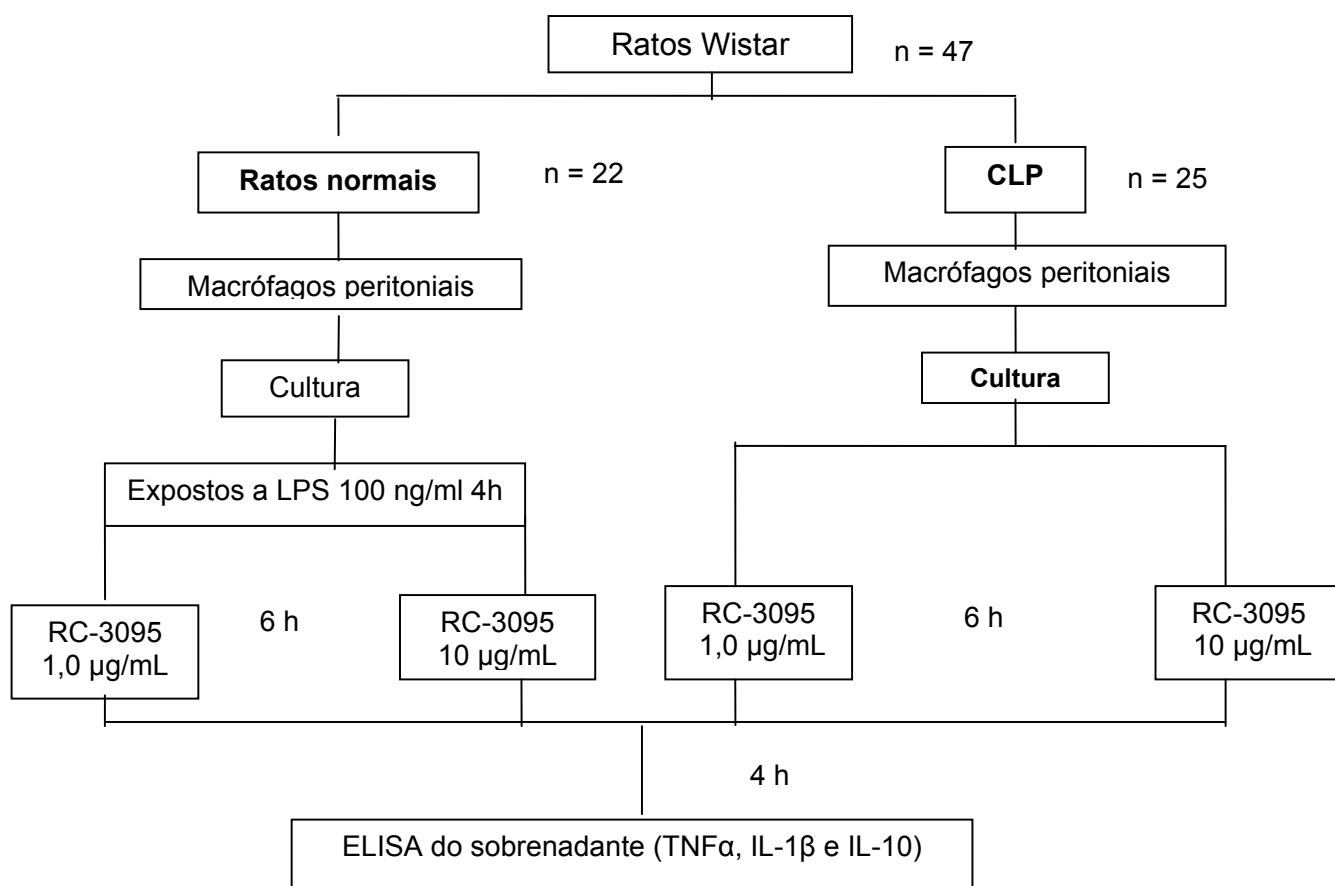


EXPERIMENTAÇÃO *in vitro*:

Ratos Wistar

n = 47

Cultura de macrófagos peritoneais



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 1997; 336: 952-3.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348: 138-150.
3. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia - United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1990; 39: 31-34.
4. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998; 26: 2078-2086.
5. Carvalho P.R.A, Trotta E.A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J Pediatr (Rio J)* 2003; 79 (supl. 2): S195-S204.
6. Boné RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of Internal Medicine*. 1996; 125(8):680-87.
7. Nathens AB, Marshall, JC. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name?. *World J Surg* 1996; 20: 386-91.
8. www.lilly.com.br/imprensa/release.
9. Glaese MP. Pathophysiology basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med* 2000; 28 Suppl: 4-8.
10. Bone RC, Balk RA, Fein AM, Perl TM, Wenzel RP, Reines HD, et al. A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *Crit care med* 1995; 23:994-1006.
11. Albertson TE, Panacek EA, MacArthur RD, Johnson SB, Benjamin E, Mastuschak GM, et al. Multicenter evaluation of a human monoclonal antibody to Enterobacteriaceae common antigen in patient with Gram negative sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:419-27

12. Lauterbach R, Pawlik D, Kowalczyk D, Ksycinski W, Helwich E, Zembala M, et al. Effect of the immunomodulating agent, pentoxifyline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: a placebo controlled, double-blind trial. *Crit Care Med* 1999;27:807-14.
13. Cronin L, Cook DJ, Carlet J. corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995;23:1430-9.
14. Annane D, S ebile V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low dose of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862-71.
15. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, et al. Immunologic and hemodynamic effects of low dose hydrocortisone in septic shock. *Am J Resp Crit Care Med* 2003;167:512-20.
16. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody human tumor necrosis factor in treatment of septic shock. *Lancet* 1998; 351:929-33.
17. Abraham E, Glauser MP, Butler T, Garbino J, Gelmont D, Laterre PF, et al. P55 Tumor necrosis factor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. *JAMA* 1997; 277:1531-8.
18. Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JFA, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med* 1997; 25:1115-24.
19. Dhainaut JF, Tenailon A, Hemmer M, Damas P, Le Tulzo Y, Radermacher P, et al. Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med* 1998; 26:1963-71.
20. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *N Eng J Med* 1997;336:912-8.

21. Sáez-Llorens X, McCracken GH. Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: current concepts of terminology, pathophysiology, and management. *J Pediatr* 1993;123:497-508.
22. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.
23. Basu S, Eriksson M. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett* 1998; 438: 159-160.
24. Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Int Care Med* 2000; 26: 474-476.
25. Zeni F, Freeman BF, Natanson C. Antiinflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit. Care Med* 1997; 25: 1095-100.
26. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl. J Med* 1999; 340: 1834-5.
27. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-72.
28. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-10.
29. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11: 153-59.
30. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutics options. *J Infect Dis* 2000; 181: 176-80.
31. Freeman BD, Buchman TG. Gene in a haystack: tumor necrosis factor polymorphisms and outcome in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 3090-1.
32. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-199.
33. Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Englan J Med* 1993; 328: 1471-7.
34. Freeman BD, Zehnbaue BA, Buchman TG. A meta-analysis of controlled trials of anticoagulant therapies in patients with sepsis. *Shock*. 2003 Jul;20(1):5-9.

35. Redl H, Gasser H, Schlag G. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* 1993; 49: 556–565.
36. Kozlov AV, Szalay L, Umar F, Fink B, Kropik K, Nohl H, Redl H, Bahrami S: EPR analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1555-1562.
37. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJM, Oirschot JFLM, Bruggen T, Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1283-1293.
38. Villa P, Ghezzi P. Effect of N-acetyl-L-cysteine on sepsis in mice. *Eur J Pharmacol* 1995; 292: 341-344.
39. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg* 1991 57: 86-88
40. Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. *Int J Immunopharmacol* 2000 22: 635-644.
41. Fujimura N, Sumita S, Aimonio M, Masuda Y, Shichinohe Y, Narimatsu E, Namiki A. Effect of free radical scavengers on diaphragmatic contractility in septic peritonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2159-2165.
42. Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003; 31[suppl]: S29-S38.
43. Kong CW, Tsai K, Chin JH, Chan WL, Hong CY. Magnolol attenuates peroxidative damage and improves survival of rats with sepsis. *Shock* 2000; 13: 24-28.
44. Thiemermann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 2003; 31 [suppl]: S76-SS84.
45. Ortolani O, Conti A, Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-Acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1907-1911.

46. Iley HF, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 768-774.
47. Anastasi A, Esparmer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Expeimentia* 1971; 27:166-167.
48. McDonald TJ, Nilson G, Vagne M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut* 1978; 19:767-774.
49. Landenheim EE, Gus JL. Bombesin receptor subtypes: implications in bombesin satiety. *Apetite* 1995; 24: 261.
50. Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD. High levels of intracellular bombesin characterize human small cell lung cancer. *Science* 1981; 214: 1246-1248.
51. Carney DN, Cuttitta F, Moody TW, Minna JD. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res* 1987; 47: 821-25.
52. Rozencurt E, Sinnett-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:2936-40.
53. Cuttita F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J et al. Autocrine growth factor in human small cell lung cancer. *Cancer Surv* 1985; 4: 707-27.
54. Adriaensen D, Scheuermann DW. Neuroendocrine cells and nerves in the lung. *Anat Rec* 1993; 236: 70-85.
55. Hoyt Jr RF, McNelly NA, Sorokin SP. Dynamics of neuroepithelial body (NEB) formation in developing hamster lung: light microscopic autoradiography after ³H-thymidine labeling *in vivo* . *Anat Rec* 1990; 227:340-350.
56. Kelley MJ, Linnoila RL, Avis IL, Georgiadis MS, Cuttita F, Mulshine JL et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody directed against gastrin-releasing peptide in patients with small cell lung cancer. *Chest* 1997; 112:256-261.

57. Moody TW, Staley J, Zia F, Coy DH, Jensen RT. Neuromedin B binds with high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates growth of small-cell lung cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:311-317.
58. Yang HK, Scott FM, Trepel JB, Battey JF, Johnson BE, Kelley MJ. Correlation of expression of bombesin-like peptides and receptors with growth inhibition by anti-bombesin antibody in small-cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 1998; 21:165-175.
59. Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J et al. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-836.
60. Schally AV, Comaru-Schally AM. Hypothalamic and other peptide hormones. In: Holland JF, Frei E, Bast Jr RC, Kufe DE, Morton DL, editors, *Cancer Medicine* 4^a ed, Baltimore: Williams & Wilkins 1997, pp 1067-1085.
61. Kim HJ, Evers MB, Banker NA, Greeley HE et al. Novel expression and regulation of gastrin gene in human ovarian cancer cell line, SW626. *Digestion Sci* 1998; 43:1465-1473.
62. Schally AV, Comaru-Schally AM. In: *Cancer Medicine*, eds Holland JF, Frei E, Bast Jr RC, Kufe DE, Pollock RE, Weichelsbaum RR, 2000, Decker, Ontario, 5^a ed, pp 715-729.
63. Sun B, Schally AV, Halmos G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept* 2000; 90: 77-84.
64. Siegfried JM, Guentert PJ, Gaither AL. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on human bronchial epithelial cells from a series of donors: individual variation and modulation by bombesin analogs. *Anat Rec* 1993; 236:241-247.
65. DeMichele MA, Gaither Davis AL, Hunt JD, Landreneau RJ, Siegfried JM. Expression of mRNA for three bombesin receptor subtypes in human bronchial epithelial cells. *Am J Resp Cell Molec Biol* 1994; 11:66-74.
66. Koh SM, Leyton J, Moody TW. Bombesin activates MAP kinase in non-small cell lung cancer cells. *Peptides* 1999;20:121-126.

67. Carney DN, Cuttita F, Moody TW, Minna JD. Selective stimulation of small cell lung cancer. *Nature* 1987;316:823-825.
68. Moody TW, Kriss RM, Fiskum G, Linde CD, Berg M, Schlesinger J. Characterization of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide in human and murine cells. *Methods Enzymol* 1989; 168:481-493.
69. Moody TW, Cuttita F. Growth factor and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Sci* 1993; 1161-1173.
70. Siegfried JM, Han YH, DeMichele MA, Hunt JD, Gaither AL, Cuttita F. Production of gastrin-releasing peptide by non-small cell lung carcinoma cell line adapted to serum-free and growth factor-free conditions. *J Biol Chem* 1994; 269:8596-8603.
71. Bologna M, Gestuccia C, Muzi P, Ciomei M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells *in vitro*. *Cancer* 1989; 63:1714-1720.
72. Kiaris H, Schally AV, Sun B, Armatis P, Groot K. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene* 1999; 18:7168-7173.
73. Nelson J, Dornelly M, Walker B, Gray J, Shaw C, Murphy RF. Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br J Cancer* 1991;63:933-936.
74. Wang QJ, Knezetic JA, Schally AV, Pour PM, Adrian TE. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int J Cancer* 1996;68:1-7.
75. Yano T, Pinski J, Groot K, Schally AV. Stimulation and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1992;52:4545-4547.
76. Cai R-Z, Radulovic S, Pinski J, Nagy A, Redding TW, Olsen DB, Schally AV. Pseudonapeptide bombesin antagonists containing C-terminal Trp or Tpi. *Peptides* 1992;13:267-71.
77. Cai R-Z, Reile H, Armatis P, Schally AV. Potent BN antagonists with C-terminal LeuΨ(CH₂N)Tac-NH₂ or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12664-12668.

78. Jensen RT, Coy DH. Progress in the development of potent bombesin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:13-19.
79. Radulovic S, Cai R-Z, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tri. *Int J Peptide Protein Res* 1991;38:593-600.
80. Mahmoud, S, Palaszynski, E, Fiskum, G., Coy, DH, Moody, TW Small cell lung cancer bombesin receptors are antagonized by reduced peptide bond analogues. *Life Sci.* 1989; 44: 367-373.
81. Moody, TW, Carney DN, Cuttitta F, Quattrocchi K, Minna JD High affinity receptors for bombesin/GRP-like peptides on human small cell lung cancer. *Life Sci.* 1985; 37: 105-113.
82. Pinski, J, Schally, AV, Halmos, G, Szepeshazi, K, Groot, K, O'Byrne, K, Cai, R-Z Effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists on the growth of human small-cell and non-small-cell lung carcinomas in nude mice. *Br. J. Cancer* 1994; 70, 886-892.
83. Qin, Y, Ertl, T, Cai, R-Z, Halmos, G, Schally, AV . Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 1994; 54: 1035-1041.
84. Qin, Y, Halmos, G, Cai, R-Z, 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: 519-528.
85. Avis, I, Jett, M, Kasprzyk, PG, Cuttitta, F, Trestion, AM, Maneckjee, R, Mulshine, JL. Effect of gastrin-releasing peptide on the pancreatic tumor cell line (Capan). *Mol. Carcinog* 1993; 8: 214-220.
86. Coy, DH, Heinz-Erian, P, Jiang, N.-Y, Sasaki, Y, Taylor, J, Moreau, JP, Wolfrey, WT, Gardner, JD, Jensen, RT. Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem* 1988; 263: 5056-5060.
87. Heimbrook, DC, Saari, WS, Balishin, NL, Friedman, A, Moore, KS, Riemen, MW, Kiefer, DM, Rotberg, NS, Wallen, JW, Oliff, A. Carboxyl-terminal

- modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. *J. Biol. Chem* 1989; 264: 11258-11262.
88. Coy, DH, Taylor, JE, Jiang, N.-Y, Klein, S.H, Wang, LH, huang, S, Moreau, JP, Gardner, JD, Jensen, RT. Short-chain pseudopeptide bombesin receptor antagonists with enhanced binding affinities for pancreatic acinar and Swiss 3T3 cells display strong antimitotic activity. *J. Biol. Chem* 1989; 264: 14691-14697.
 89. Saeed, ZA, Huang, SC, Coy, DH, Jiang, NY, Heinz-Erian, P, Mantey, S, Gardner, JD, Jensen, RT. Effect of substitutions in position 12 of bombesin on antagonist activity. *Peptides* 1989; 10; 597-603.
 90. Cai, R.-Z, Qin, Y, Ertl, T, Schally, AV. New pseudo-nonapeptide bombesin antagonists with C-terminal LeuY(CH₂N)Tac-NH₂ showing high binding affinity to bombesin/GRP receptors on CFPAC-1 human pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol* 1995; 6: 1165-1172.
 91. Camble, R, Cotton, R, Dutta, AS. N-isobutyryl-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-NHMe (ICI 216140) a potent *in vivo* antagonist analogue of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) derived from the C-terminal sequence lacking the final methionine residue. *Life Sci* 1989; 45: 1521-1527.
 92. Mahmoud, S, Staley, J, Taylor, J, Bodgen, A, Moreau, JP, Coy, D, Avis, I, Cuttitta, F, Mulshine, JL, Moody, TW [Psi 13,14] bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1991; 51: 1798-1802.
 93. Saari, WS, Heimbrook, DC, Friedman, A, Fisher, TW. A gastrin-releasing peptide antagonist containing A psi (CH₂O) amide bond surrogate. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989; 165: 114-117.
 94. Woll, PJ, Rozengurt, E. [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 1859-1863.
 95. Wang, L-H, Coy, D-H, Taylor, JE, Jiang, N-Y, Kim, SH, Moreau, JP, Huang, SC, Mantey, SA, Frucht, H, Jensen, RT. Desmethionine alkylamide bombesin analogues: a new class of bombesin receptor antagonists with potent

- antiseecretory activity in pancreatic acini and antimitotic activity in Swiss 3T3 cells. *Biochemistry* 1990; 29: 616-622.
96. Wang, L-H, Coy, D-H, Taylor, JE, Jiang, N-Y, Moreau, JP, Huang, SC, Frucht, H, Haffar, BM, Jensen, RT. des-Met carboxyl-terminally modified analogues of bombesin function as potent bombesin receptor antagonists, partial agonists, or agonists. *J. Biol. Chem* 1990; 265: 15695-15703.
 97. Chatzistamou, I, Schally, AV, Sun, B, Armatis, P, Szepeshazi, K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br. J. Cancer* 2000; 83: 906-913.
 98. Koppan, M, Halmos, G, Arencibia, JM, Lamharzi, N, Schally, AV. Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the level and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1335-1343.
 99. Jungwirth, A, Schally, AV, Pinski, J, Halmos, G, Groot, K, Armatis, P, Vadillo-Buenfil, M. Inhibition of *in vivo* proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Br. J. Cancer* 1997; 75: 1585-1592.
 100. Miyazaki, M, Lamharzi, N, Schally, AV, Halmos, G, Szepeshazi, K, Groot, K, Cai, R-Z. Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3950. *Eur. J. Cancer* 1998, 34: 710-717.
 101. Pinski, J, Halmos, G, Schally, AV. Somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of androgen-independent DU-145 human prostate cancer line in nude mice. *Cancer Lett* 1993; 71: 189-196.
 102. Pinski, J, Halmos, G, Yano, T, Szepeshazi, K, Qin, Y, Ertl, T, Schally, AV . Inhibition of growth of MKN-45 human gastric-carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analog RC-160. *Int. J. Cancer* 1994; 57: 574-580.

103. Pinski, J, Reile, H, Halmos, G, Groot, K, Schally, AV. Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 169-174.
104. Radulovic, S, Miller, G, Schally, AV. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res* 1991; 51: 6006-6009.
105. Radulovic, S, Schally, AV, Reile, H, Halmos, G, Szepeshazi, K, Groot, K, Milovanovic, S, Miller, G, Yano, T. Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. *Acta Oncol* 1994; 33: 693-701.
106. Shirahige, Y, Cai, R-Z, Szepeshazi, K, Halmos, G, Pinski, J, Groot, K, Schally, AV. Inhibitory effect of bombesin gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3095-II and RC-3095 on MCF7 MIII human breast cancer xenografts in nude mice. *Biomed. Pharmacother* 1994; 48: 465-472.
107. Szepeshazi, K, Schally, AV, Halmos, G, Groot, K, Radulovic, S. Growth inhibition of estrogen-dependent and estrogen-independent MXT mammary cancers in mice by the bombesin and gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095. *J. Natl. Cancer Inst* 1992; 84: 1915-1922.
108. Szepeshazi, K, Schally, AV, Groot, K, Halmos, G. Effect of bombesin, gastrin-releasing peptide (GRP)(14-27) and bombesin/GRP receptor antagonist RC-3095 on growth of nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. *Int. J. Cancer* 1993; 54: 282-289.
109. Horowitz M. Estudo sobre a segurança e a viabilidade do uso clínico do novo antagonista da bombesina, RC-3095, em pacientes portadores de neoplasias sólidas avançadas: análise toxicológica confirmatória em roedores e resultados preliminares do primeiro estudo fase I em humanos. Tese de Doutorado da UFRGS, 2000. Submetida à publicação na Revista *Investigational New Drugs*.
110. Hajri, A, Balboni, G, Koenig, M, Garaud, JC, Damge, C. Gastrin-releasing peptide: *in vivo* and *in vitro* growth effects on an acinar pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 3726-2732.

111. Yano, T, Pinski, J, Szepeshazi, K, Halmos, G, Radulovic, S, Groot, K, Schally, AV. Inhibitory effect of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) antagonist RC-3095 and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* 1994; 73: 1229-1238.
112. Szepeshazi, K, Schally, AV, Cai, R-Z, Radulovic, S, Milovanovic, S, Szoke, B. Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analogue RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. *Cancer Res* 1991; 51: 5980-5986.
113. Jungwirth, A, Pinski, J, Galvan, G, Halmos, G, Szepeshazi, K, Cai, RZ, Groot, K, Vadillo-Buenfil, M, Schally, AV. Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer *in vivo* by luteinising hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC-3940-II and RC-3950-II. *Eur J Cancer* 1997;33: 1141-1148.
114. Milovanovic, SR, Radulovic, S, Groot, K, Schally, AV. Inhibition of growth of PC-82 human prostate cancer line xenografts in nude mice by bombesin antagonist RC-3095 or combination of agonist [D-Trp6]-luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin analog RC-160. *Prostaglandins* 1992; 20: 269-280.
115. Pinski, J, Schally, AV, Halmos, G, Szepeshazi, K. Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC-3 human prostate-cancer xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer* 1993; 55: 963-967.
116. Halmos G, Schally AV. Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:956-960.
117. Ullrich, A, Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61: 203-212.
118. Liebow C, Crean D, Lee MT. et al. Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:3804-8.
119. Lee, M.T., Liebow, C., Krebs, L.J., Schally, A.V. (1993). Bombesin and gastrin-releasing peptide (GRP) induce phosphorylation and up-regulation of

- epidermal growth factor receptor Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res., 34: 244 (abstract).
120. Liebow, C, Lee, MT, Krebs, L, Schally, AV. Bombesin may stimulate growth through up-regulation of EGF receptors. *Pancreas* 1992; 7 – 746 (abstract).
121. Budillon, A, Tagliaferi, P, Caraglia, M, Torrì, MR, Normanno, N, Iacobelli, S, Palmieri, G, Stoppelli, MP, Frati, L, Bianco, AR. Upregulation of epidermal growth factor receptor induced by alpha-interferon in human epidermoid cancer cells. *Cancer Res* 1991; 51: 1294-1299.
121. Reubi, JC, Kvolz, L. Somatostatin receptors in human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1992; 52: 6074-6078.
123. Pinski, J, Halmos, G, Szepeshazi, K, Schally, AV. Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptides as adjuncts to agonists of luteinizing hormone-releasing hormone in the treatment of experimental prostate cancer. *Cancer* 1993; 72: 3263-3270.
124. Damstrup, L, Rygaard, K, Spang-Thomsen, M, Poulsen, HS. Expression of the epidermal growth factor receptor in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 3089-3093.
125. Macaulay, VM, Everard, MJ, Teale, JD, Trott, PA, Van Wyk, JJ, Smith, IE, Millar, JL. Autocrine function for insulin-like growth factor I in human small cell lung cancer cell lines and fresh tumor cells. *Cancer Res* 1990; 50: 2511-2517.
126. Minuto, F, Del Monte, P, Baarraeca, A, Alama, A, Cariola, G, Giordano, G. *Cancer Res* 1988; 48: 3716-3719.
127. Reeve, JG, Morgan, J, Schwander, J, Bleehen, NM. Role for membrane and secreted insulin-like growth factor-binding protein-2 in the regulation of insulin-like growth factor action in lung tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 4680-4685.
128. Veale, D, Ashcroft, T, March, C, Gibson, GJ, Harris, AL. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 1987; 55: 513-516.
129. Jungwirth, A, Galvan, G, Pinski, J, Halmos, G, Szepeshazi, K, Cai, RZ, Groot, K, Schally, AV. Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice. *Prostate* 1997; 32: 164-172.

130. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos GA. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci* 1997 ; 94:10913-18.
131. Schwartzmann, G, Di Leone, L, Horowitz, M, Campos Jr, OR, Cancellata, AP, Cancellata, AIN, Mans, DR, Sander, E, Ferreira Filho, AF, Schuemann, H, Viegas, MAV. Phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in patients with advanced solid malignancies. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: 194a:746.
132. Mountaim C, Carr D, Andereson W. A system for the clinical staging of lung cancer. *AJR* 1974;120:130.
133. Common Toxicity Criteria; version 2.0; National Institute of Health; National Cancer Institute.
134. Simon R. Optimal two stage desing for phase II clinical trials controlled. *Clin Trials* 1989; 10:1-10.
135. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457-481.
136. Shijubo N, Yamaguchi K, Hirasawa M, Shibuya Y, Inuzuka M, Kodama T, Abe S. Progastrin-releasing peptide(31-98) in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 154(6 Pt 1):1694-9.
137. Lemaire I, Jones S, Khan MF. Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. *Neuropeptides*. 1991 20(1):63-72.
138. Piguet PF, Vesin C, Thomas F. Bombesin down modulates pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin. *Exp Lung Res*. 1995 21(2):227-37.
139. 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(5): 601-11.
140. Ter Beek WP, Muller ES, Van Hogezaand RA, Biemond I, Lamers CB. Gastrin releasing peptide receptor expression is decreased in patients with Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *J Clin Pathol*. 2004 57(10):1047-51.

141. Alican I, Unluer EE, Yegen C, Yegen BC. Bombesin improves burn-induced intestinal injury in the rat. *Peptides*. 2000 21(8):1265-9.
142. Gulluoglu BM, Kurtel H, Gulluoglu MG, Aktan AO, Yegen BC, Dizdaroglu F, Yalin R, Yegen BC. Bombesin ameliorates colonic damage in experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 1999 44(8):1531-8.
143. Guo YS, Hellmich MR, Wen XD, Townsend CM Jr. Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2001 276(25):22941-7.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Gastrin releasing peptide antagonist inhibits TNF- α and IL-1 β release and improves survival in experimental sepsis

Felipe Dal-Pizzol¹, Luciane Pons Di Leone², Cristiane Ritter¹, Márcio Rodrigo Martins¹, Adalisa Reinke¹, João Rocha¹, Rafael Roesler³, and Gilberto Schwartsmann²

¹Experimental Physiopathology Laboratory, UNESC, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

e-mail: pizzol.ez@terra.com.br.

²Graduate Program in Medical Sciences and Department of Internal Medicine, Academic Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

³Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

The authors have studied the effects of the novel synthetic inhibitor of the bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) pathway, RC-3095, in the cecal ligation puncture (CLP) model of experimental sepsis and in the acute lung injury (ALI) in Wistar rats. The effect of RC-3095 on overall mortality of treated animals and control was initially studied. Tissue samples were then collected from treatment and control animals for the evaluation of tissue damage by conventional histopathology, as well as for the study of oxidative damage. Peritoneal macrophages were prepared from freshly isolated peritoneal exudates of Wistar rats. For the isolation of macrophages, peritoneal exudate cells kept in RPMI-1640 medium supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum were cultured in Petri dishes. Macrophages were then cultured further in 10% fetal bovine serum in RPMI-1640 medium. Macrophages isolated from normal rat were exposed to LPS and then assigned to RC-3095 or not and TNF- α , IL-1 β and IL-10 levels were determined. Macrophages isolated from CLP exposed animals were cultured and treated with or without RC-3095 for the determination of TNF- α , IL-1 β and IL-10. Our results showed that RC-3095 reduces mortality of Wistar rats in the CLP and ALI models. This effect was associated with a decrease in tissue damage, as observed by conventional histopathology studies and measurements of tissue oxidative damage. The above mentioned effects could be explained, at least partially, by the inhibition of macrophage release of TNF- α and IL-1 β , which could interfere in various processes related to sepsis progression. Notably, RC-3095 did

not modulate the release of IL-10, suggesting that the intracellular pathway modulated by bombesin/GRP is selective for pro-inflammatory cytokines.

INTRODUCTION

Septic shock has become one of the most frequent causes of morbidity and mortality in intensive care units (1). Treatment of sepsis consists of supporting blood pressure, organ blood flow and ventilation, along with an emphasis on antibiotics and eradicating the sources of infection. Despite significant advances in the understanding of pathogenesis of sepsis and its management, the mortality from septic shock has improved little over the last several decades (2). Septic shock is a systemic response to severe bacterial infections that induce the generation of proinflammatory factors including tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 α , IL-6, IL-12, interferon (IFN- α), nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) (3). Thus, the search for endogenous modulators that counterbalance the generation of proinflammatory cytokines without severe effects might reveal an alternative therapy for septic shock, but to date anti-inflammatory strategies produced modest clinical effects in critically ill patients (4). This could be secondary to several factors, including the heterogeneous inflammatory response associated with these conditions (3) and the misleading design of pre-clinical studies (5,6). During the past years, a series of basic scientific observations have focused sepsis research on new treatment protocols that could be administered late after sepsis induction to more closely resemble clinical practice (7-12).

The bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) pathways were shown to participate in the regulation of several aspects of CNS function (13). These peptides might be involved in neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia and autism, and in certain autocrine pathways for cancer growth (14-16). In addition, the bombesin/GRP pathway has several effects on the immune function.

GRP are synthesized by immune cells, especially under inflammatory and antigen stimulation conditions. The immunological effects of GRP are exerted through binding to its specific receptor, which seems to stimulate primarily protein kinase C (17). GRP induces mast cell proliferation and chemotaxis *in vitro* (18,19). Furthermore, GRP modulates, as a stimulator or inhibitor, the function of lymphocytes, phagocytes and natural killer cells (20-23). GRP seems to have stimulatory effects on mobility, ingestion and superoxide production in macrophages from adult mice, potentiating IL-1 release by alveolar macrophages activated with lipopolysaccharide (LPS) (24-26). Thus, it appears to be involved in the pathogenesis of some inflammatory conditions such as chronic bronchitis (27), pulmonary fibrosis (28).

The role of bombesin/GRP pathways in acute inflammatory conditions and the therapeutic potential of interventions in the bombesin/GRP pathway to improve survival in sepsis are still unknown. To explore these points, here we report that a selective GRP receptor antagonist, (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) bombesin (RC-3095), attenuates the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) *in vitro* and *in vivo*. Treatment with RC-3095 diminishes organ damage and improves survival in sepsis, even when the treatment is initiated late after the onset of the disease. In addition RC-3095 diminishes the lung damage induced by the intra-tracheal instillation of LPS in an established model of acute lung injury (ALI). These experimental models demonstrate the involvement of the bombesin/GRP pathways in the control of inflammation and support the inhibition of GRP receptor as an anti-inflammatory strategy for the treatment of sepsis and acute lung injury.

MATERIALS AND METHODS

In vivo studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

a) Cecal ligation puncture (CLP) model

Male Wistar rats 2-3 month old, subjected to CLP as we previously described (11), were used in this study. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), given intraperitoneally. Under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum with adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0 silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated once with a 14-gauge needle. The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site. The cecum was then returned to the peritoneal cavity and the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. Septic rats in this model become bacteremic with gram-negative enteric organisms (11).

b) Biochemical measurements and histopathological analyses in the CLP model

For the purpose of biochemical measurements and histopathological analyses 24 rats were made septic by CLP. These animals were divided into four groups; 1 - sham operated, 2 - CLP, 3 - CLP plus "basic support" (saline s.c. at 50ml/kg 6h and 12h after CLP plus ceftriaxone s.c. at 30mg/kg and clindamycin s.c. 25mg/kg every 6h, starting 6h after CLP), and 4 - same as group 3 with RC-

3095 s.c. at 5mg/kg, once a day, starting 6h after CLP. Blood was drawn from the caudal vein 3h (i.e. before treatment) and 12h (i.e. 6h after treatment) after CLP. The volume of blood drawn was replaced with subcutaneous saline. Eighteen four hours after the treatment beginning (i.e. 24hs after sepsis induction) the rats were killed by decapitation followed by the harvesting of samples from the blood (by cardiac puncture), lung, liver, kidney, heart and ileum that were immediately stored at -70° C for biochemical measures. For histopathological analyses after fixation, excised tissues were embedded in paraffin and then routinely stained with hematoxylin and eosin. A blinded experienced pathologist performed histopathological analyses.

Serum TNF- α , IL-1 β and IL-10 levels were determined 3h, 12h and 24h after CLP by ELISA with commercial available kits (R&D systems, Minneapolis, MN). Serum markers of liver (AST, ALT) kidney (urea, creatinine) and pancreatic (amylase) damage were determined 3h, 12h and 24h after CLP by commercial available kits (Labtest, São Paulo, Brazil).

As an index of oxidative stress we used the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction as previously described (29). Briefly, the sample was mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0,67% (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results are expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein (Lowry assay). In addition we determined the oxidative damage to proteins as previously described (30). Briefly, protein were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and

redissolved in dinitrophenylhydrazine (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and the absorbance read at 370nm.

All these analyses were performed by investigators blinded to the treatment.

c) Survival in the CLP model

Survival was tested in a separated cohort of animals in a randomized, blinded study. In a first protocol, animals exposed to CLP were randomly assigned to receive RC-3095 1h before CLP (n=22, s.c at 5mg/kg, single dose) or 1h after (n=25, s.c. at 5mg/kg, single dose) CLP induction. In a second set of experiments, the effect of RC-3095 with “basic support” and delayed administration (6h after CLP) was analyzed to more closely resemble the clinical practice. The animals were challenged with CLP and treated with 1 - “basic support” (n=32, saline s.c. at 50ml/kg 6h and 12h after CLP plus ceftriaxone s.c. at 30mg/kg and clindamycin s.c. 25mg/kg every 6h for three days, starting 6h after CLP) or 2 - “basic support” with RC-3095 (n=40, s.c at 5mg/kg, once a day for two days, starting 6h after CLP). In all these experiments a sham-operated group and a CLP group without treatment were included to comparison. The mortality of the animals was recorded over a 10-day period.

d) Acute Lung Injury model

Adult male Wistar weighing approximately 250 to 300g were used in this study. Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and acute lung injury (ALI) was induced by intratracheal instillation of LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma Chemical, St. Louis, MO) at dose of 100µg/100g

body weight. The animals were divided into three groups: group 1 - instillation of isotonic saline (control group, n=12), group 2 - ALI treated with saline (n=12), group 3 - ALI treated with RC-3095 (5 mg/kg, s.c. 6h after ALI, n=12).

Twelve hours after LPS instillation, the rats were killed (n=6 each group) and a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed. The BAL fluid (BALF) was centrifuged (1000 g for 10 min) and the cell pellet used to determine the total cell count and differential. To estimate the degree of alveolar cell injury and the alveolar-capillary membrane compromise BALF protein and LDH content were determined. BALF cells were evaluated using a Neubauer chamber stained with Giemsa or Trypan blue exclusion dye. BALF total protein content was determined by the Lowry assay. BALF total LDH content was determined using a spectrophotometer by commercially available kits (LabTrade, Brazil). In a separated cohort of animals ALI was induced as described above to isolate lung tissue. Twelve hours after LPS instillation, the rats were killed (n=6 each group) and samples from the lung were isolated and immediately stored at -70° C until assayed for oxidative stress parameters or fixed in 4% formalin solution for histopathological analyses as described to the CLP model.

3. Macrophage release of TNF- α , IL-1 β and IL-10

Peritoneal macrophages were prepared from freshly isolated peritoneal exudates of Wistar rats (normal rat or rat 4 hrs after CLP). For the isolation of macrophages 2×10^7 peritoneal exudate cells in 10 mL of RPMI-1640 medium (Sigma Chemical, St. Louis, MO) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum were cultured in Petri dishes for 60 mins at 37°C. Then

macrophages were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum for further 4 hours. After this period macrophages isolated from normal rat were exposed to LPS (100ng/ml for 4h) and then assigned to RC-3095 (1µg/ml or 10µg/ml) or not. After 6h the medium was recovered to the determination of TNF-α, IL-1β and IL-10. Macrophages isolated from CLP exposed animals were cultured as described above and treated with or without RC-3095 for 6h. After this period the medium was recovered to the determination of TNF- α, IL-1 β and IL-10.

RESULTS

a) Treatment with GRP antagonist prevents organ damage and modulates pro-inflammatory cytokines in experimental sepsis

To determine whether RC-3095 treatment could interfere with organ failure associated to sepsis progression we determine plasmatic markers of organ damage, or histopathological alterations secondary to sepsis. We started treatment 6hs after the induction of sepsis, the time at which animals clear presents signs of sepsis, and provide basic support (antibiotics plus fluid resuscitation) to all animals to more closely resemble clinical practice. RC-3095 treatment attenuated pancreatic (as assessed by circulating amylase levels), hepatic (as assessed by circulating AST and ALT levels), and to a less extent kidney damage (as assessed by urea and creatinine circulating levels) (Table 1). RC-3095 treatment did not modified leukocyte and platets counts and creatine kinase levels (data not shown).

RC-3095 treatment could attenuate some of the histopathological alterations observed under optic microscopic observation. GRP antagonist diminished the ileal inflammatory infiltration (Figure 1A and 1B), alveolar edema and inflammatory infiltration (Figure 1C and 1D) and to a less extent renal tubular necrosis (Figure 1E and 1F), as compared to basic support. RC-3095 treatment attenuated oxidative damage in several organs associated with the septic response as assessed by TBARS and protein carbonyls levels (Figures 2A and 2B). This effect was more pronounced in the kidney, ileum and heart (Figures 2A and 2B).

In addition, this delayed administration of RC-3095 attenuated circulating TNF- α and IL-1 β levels 12 and 24hs after sepsis induction (Table 1), but not modified IL-10 levels (data not shown) at these same times. Cytokines levels did not differ between groups 3h after sepsis induction (i.e. before treatment administration - data not shown).

b) GRP antagonist treatment improves survival in experimental sepsis

We conducted an initial evaluation of RC-3095 as a therapeutic agent for systemic inflammation in a well established model of abdominal sepsis. The prophylactic administration (1h before) or the administration of RC-3095 (5mg/kg, s.c. single dose) early after CLP (1h after) without basic support significantly improved survival by approximately 50% (Figure 3A). To more closely resemble clinical practice we administered RC-3095 concomitant to basic support, when sepsis is fully established in the model. The delayed RC-3095 administration, FOR BOTH 6H OR 24H AFTER CLP significantly improved survival even when administered with basic support (Figure 3B). RC-3095 administration 6 hours after CLP in a single dose did not improved mortality when compared to “basic support”

(data not shown), but the protective effect was pronounced in animals receiving RC-3095 once a day for 2 days plus basic support (Figure 3B).

c) GRP antagonist treatment attenuates damage in experimental acute lung injury

To further characterize the effects of RC-3095 in acute inflammatory conditions we determined the effects of RC-3095 in an experimental model of ALI induced by LPS. RC-3095 administration 3h after ALI induction partially protects lung parenchyma from LPS-induced oxidative damage. TBARS (control = 0.051 ± 0.005 nm/mg protein, ALI = 0.69 ± 0.01 nm/mg protein, ALI + RC3095 = 0.4 ± 0.01 nm/mg protein; $p < 0.05$), but not protein carbonyls (data not shown) diminished after RC-3095 treatment. GRP antagonist attenuated the alveolar inflammatory infiltration and alveolar exudation induced by LPS (Figure 4A and 4B). These findings were supported by the BALF content of inflammatory cells, LDH and protein content (Table 2). RC-3095 administration reduced the BALF total inflammatory cell content, protein exudation and LDH content. These results reinforced the protective and antiinflammatory effects of RC-3095 treatment demonstrated for the CLP model.

d) GRP antagonist modulate TNF- α and IL-1 β , but not IL-10, release from macrophages

To determine whether RC-3095 directly interfered with macrophage release of TNF- α , IL-1 β and IL-10, these cytokines were measured in conditioned medium of macrophage cultures activated with LPS or CLP. We stimulated primary cultures of rat peritoneal macrophages with endotoxin and treated them with RC-3095. GRP antagonist attenuated LPS-induced TNF- α and IL-1 β accumulation in the

culture media of macrophages in a concentration-dependent manner, with a more pronounced effect at a physiologic relevant dose of 10 µg/ml (Table 3). This effect was evident at 1µg/ml (data not shown). GRP antagonist did not interfere with the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in both doses studied (data not shown). These results were similar when peritoneal macrophages from CLP rats were studied. The release of TNF-α and IL-1β, but not IL-10, by CLP-activated macrophages was attenuated, with a maximum inhibition of 50% at a 10µg/ml concentration (Table 2). RC-3095 at 1µg/ml also attenuated TNF-α and IL-1β released from CLP-activated macrophages (data not shown).

DISCUSSION

Here, we report on the beneficial effects of the selective bombesin/GRP receptor antagonist, RC-3095, in a well-established model for experimental sepsis and acute lung injury. These results demonstrated a major role of bombesin/GRP pathways on the inflammatory response in sepsis and acute lung injury induced by LPS. This approach may provide advantages that can be exploited for the treatment of inflammatory disorders. RC-3095 modulates the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) by activated macrophages, leading to a diminution of oxidative damage, inflammatory infiltration and organ dysfunction, thus improving mortality in a clinically relevant model of sepsis.

Previous work had shown that GRP exert a significant modulation on the different steps of the macrophage activation *in vitro* and *in vivo* (19,22,23). But it was unknown whether this pharmacological strategy could be used *in vivo* to improve survival in sepsis and the role of this pathway on immune response to LPS and sepsis induced by CLP. Although it seems that the overwhelming inflammatory response is central to the pathogenesis of septic shock, currently used anti-inflammatory strategies have a limited clinical effect in sepsis and acute respiratory distress syndrome patients (4). This could be secondary to several factors, including the heterogeneous inflammatory response associated with these conditions (3) and the misleading design of pre-clinical studies (23,24).

In our study, we demonstrate that RC-3095 inhibits macrophage release of TNF- α and IL-1 β and this could block several processes associated with sepsis progression. Interestingly, RC-3095 did not modulate the release of the anti-

inflammatory IL-10, suggesting that the intracellular pathway modulated by bombesin/GRP is selective to pro-inflammatory cytokines. Some of the actions of bombesin/GRP seem to involve the activation of PKC (18). GRP chemo-attractant effects on murine peritoneal macrophages and lymphocytes are at least in part mediated through PKC activation (17). Bombesin, a homolog of GRP, effects upon COX-2 expression in intestinal cell lines requires an increase in $[Ca^{+2}]$, activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and -2 and p38MAPK, and increased activation and expression of the transcription factors Elk-1, ATF-2, c-Fos, and c-Jun (31).

Reactive oxygen species (ROS) exhibit several pro-inflammatory properties pertinent to septic shock (32-34). Besides its pro-inflammatory effects, ROS possess a number of cytotoxic mechanisms, and induces the activation of the nuclear enzyme poly (adenosine 5'- diphosphate-ribose) polymerase, depletion of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and adenosine triphosphate, which leads to irreversible cellular damage as evidenced in septic shock (35). Antioxidants inhibit the release of TNF, the activation of proinflammatory cytokines, cellular apoptosis and necrosis (36). In our study, RC-3095 could attenuate oxidative damage in several organs associated with the sepsis response and lung oxidative damage in ALI. In addition, RC-3095 could attenuate the inflammatory infiltration and these effects could, in part, be responsible to the protective effects demonstrated. It seems that RC-3095 did not exhibit direct antioxidant or antibiotic effects (data not shown).

Little is known about the physiologic effects of GRP on immune function and the possibility to explore these functions to the pharmacological approach of inflammatory conditions. Our results suggest that RC-3095 can inhibit TNF- α and

IL-1 β release from activated macrophages and this could represent a possible pharmacological target to control systemic inflammation. In different animal models of inflammatory conditions, RC-3095 was able to attenuate damage and improve survival. To our knowledge, this is the first report of a protective effect of a bombesin/GRP antagonist in experimental sepsis. Further investigation is warranted to determine the intracellular pathways associated with these effects, the exact role of GRP on immune response and the potential clinical utilization of bombesin/GRP antagonists.

LITERATURE REFERENCES

1. Sands KE, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278, 234-240.
2. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998; 26: 2078-2086.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348: 138-150.
4. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 1197-1205.
5. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 2002; 7:113–7.
6. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, et al. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3_ to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1241–50.
7. Mellar CA, Henriques JAP, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides* 25 2004; 585–588.
8. Schwartzmann, G. *et al. Lung Cancer* 2004 46(1); 129.

9. Genton L, Kudsk KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *American Journal of Surgery* 2003; 186: 253–258
10. 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: 601–611.
11. Medina S, Del Rio M, Vctor VM, Hernanz A, De la Fuente M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mechanisms of Ageing and Development* 1998; 102: 249-261.
12. Medina S, Del R.o M, De la Cuadra B, Guayerbas N, De la Fuente M. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides* 1999; 33: 173-179.
13. De la Fuente, M., Del Rio, M., Ferrandez, M.D., and Hernanz, A., Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991; 73: 205-211.
14. Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente M. 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: 549-555.
15. De la Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sciences* 2000; 67: 2125-2135.

16. De la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991; 73: 205-211.
17. Lemaire I. Bombesin-related peptides modulate interleukin-1 production by alveolar macrophages. *Neuropeptides*. 1991; 20: 217-223.
18. Del Rio M, De la Fuente M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept*. 1994; 49:185-193.
19. Meloni F, Bertoletti R, Corsico A, Di Fazio P, Cecchetti M, Gialdroni-Grassi G. Bombesin/gastrin releasing peptide levels of peripheral mononuclear cells, monocytes and alveolar macrophages in chronic bronchitis. *Int J Tissue React*. 1992; 14: 195-201.
20. Lemaire I, Jones S, Khan MF. Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. *Neuropeptides* 1991; 20: 63-72.
21. Ritter C, Andrades M, Reinke A, et al: Treatment with *N*-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 342–349.
22. Roesler, R. *et al. Trends Pharmacol. Sci.* 2004 ; 25, 241-242.
23. Ritter, C. *et al. Lancet* 2004 ; 364, 498-499.
24. Polderman, K.H. *et al. Lancet* 2004; 363, 1721-1723.
25. Guo Y-S, Hellmich MR, Wen XD, Townsend CM. Activator Protein-1 Transcription Factor Mediates Bombesin-stimulated Cyclooxygenase-2 Expression in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 22941–22947.

26. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, et al: Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 685–692.
27. Fantone JC, Ward PA. A review: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395–418.
28. Ritter C, Andrades ME, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CTS, Menna-Barreto S, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Int Care Med* 2003; 29: 1782-1789.
29. Szabó C, Dawson VL. Role of poly(ADPribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 19: 287–298.
30. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. *N*-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992; 140: 390–399.

Table 1 - Serum biochemical markers of organ damage and inflammatory response after CLP.

	CLP		BS		RC-3095	
	Time after CLP					
	12h	24h	12h	24h	12h	24h
Urea (mg/dl)	48 ± 1.3	54 ± 2.1	47 ± 1.7	26 ± 0.6*	27 ± 0.9*	27 ± 0.5*
Creatinine (mg/dl)	0.3 ± 0.01	0,4 ± 0.03	0,4 ± 0.03	0,3 ± 0.01	0,2 ± 0.01	0,2 ± 0.02
TGO (U/l)	418 ± 23	497 ± 31	425 ± 26	393 ± 32	276 ± 19*	301 ± 21*
TGP (U/l)	87 ± 7	102 ± 12	102 ± 10	87 ± 9	59 ± 7*	52 ± 10
Amylase (U/l)	3136 ± 100	2970 ± 99	2956 ± 129	2863 ± 131	2010 ± 102*	1900 ± 121*
TNF-α (pg/ml)	3400 ± 198	2600 ± 175	2100 ± 99*	1200 ± 102*	1130 ± 92**	1021 ± 102*
IL-1α (pg/ml)	430 ± 41	338 ± 37	367 ± 44	201 ± 32*	209 ± 24*	178 ± 21*

CLP - septic group (n=6)

BS - septic group with basic support (n=6)

RC-3095 - septic group with basic support plus RC-3095 (n=6)

* different from CLP group, p<0.05

** different from BS group, p<0.05

Table 2 - Cellular and biochemical parameters in the BALF of rats 12 hours after intratracheal LPS

Group	Total cell count ($\times 10^5$)	Total protein (mg/ml)	LDH activity (U/l)
Control	51 \pm 3.4	40 \pm 3.2	1.2 \pm 0.1
LPS	500 \pm 21*	78 \pm 6.5*	16.2 \pm 2.3*
LPS + RC	97 \pm 4.6 **	37 \pm 2.1	8.3 \pm 1.2**

Control - saline instillation (n=6)

LPS - LPS induced acute lung injury (n=6)

LPS + RC - LPS induced acute lung injury plus RC-3095 (n=6)

* different from control, $p < 0.05$

** different from LPS, $p < 0.05$

Table 3 - TNF- α and IL-1 β released by peritoneal macrophages isolated from normal rat exposed to LPS (100ng/ml) or isolated from CLP exposed animals treated or not with RC-3095.

	TNF- α	IL-1 β
M-LPS	1400 \pm 102	250 \pm 19
M-LPS + RC	540 \pm 86*	102 \pm 12*
M-CLP	1983 \pm 213	287 \pm 32
M-CLP + RC	890 \pm 123*	134 \pm 11*

M-LPS - peritoneal macrophages isolated from normal rat exposed to LPS

M-LPS + RC - as M-LPS treated with RC-3095

M-CLP - peritoneal macrophages isolated from CLP rats

M-CLP + RC - as M-CLP treated with RC-3095

* different from M-LPS or M-CLP, $p < 0.05$

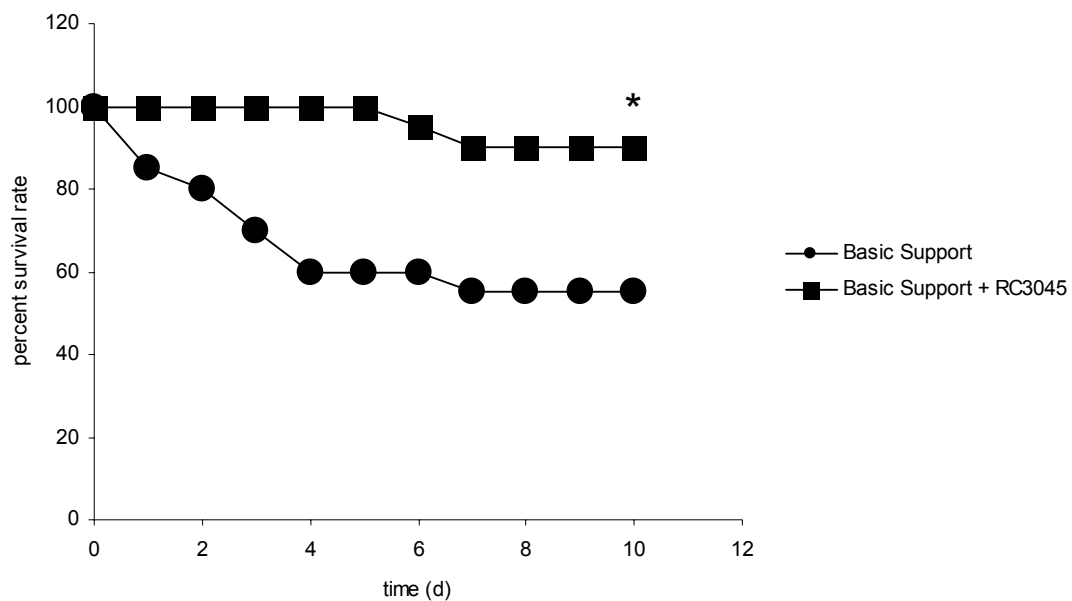


Figure 1 - Thiobarbituric acid reactive species content in major organs associated with septic response. Rats were sham-operated or submitted to cecal ligation and puncture (CLP). CLP animals were assigned to receive “basic support”, RC-3095 with “basic support”, or only saline as described under “Material and Methods”. 24 hours after CLP the heart, ileum, liver, lung and kidney were removed to the determination of thiobarbituric acid reactive species content as described under “Material and Methods”. Values are expressed as means \pm S.D. (n=6 each group).

* different from sham-operated, $p < 0.05$

** different from CLP, $p < 0.05$

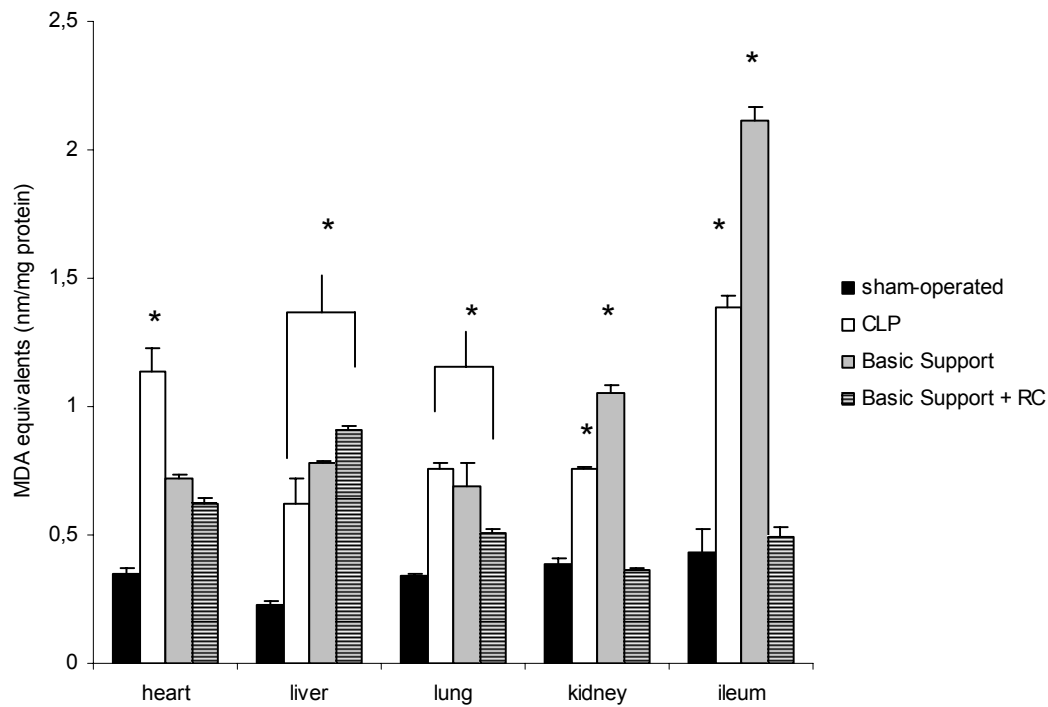


Figure 2 - Protein carbonyls content in major organs associated with septic response. Rats were sham-operated or submitted to cecal ligation and puncture (CLP). CLP animals were assigned to receive “basic support”, RC-3095 with “basic support”, or only saline as described under “Material and Methods”. 24 hours after CLP the heart, ileum, liver, lung and kidney were removed to the determination of protein carbonyls content as described under “Material and Methods”. Values are expressed as means \pm S.D. (n=6 each group).

* different from sham-operated, $p < 0.05$

** different from CLP, $p < 0.05$

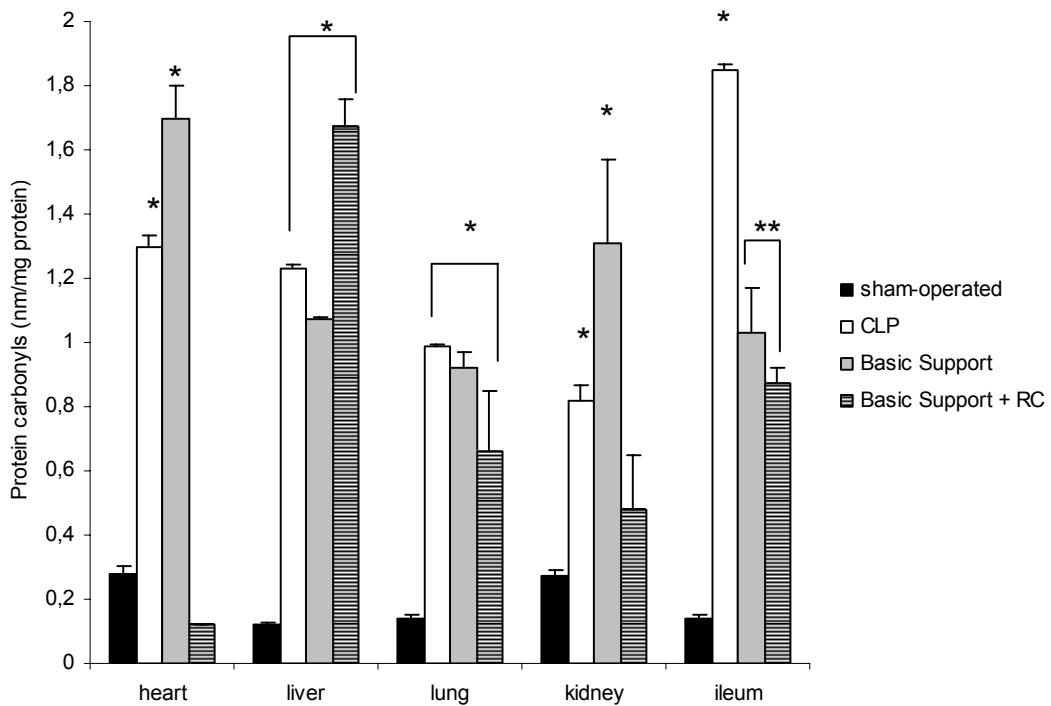
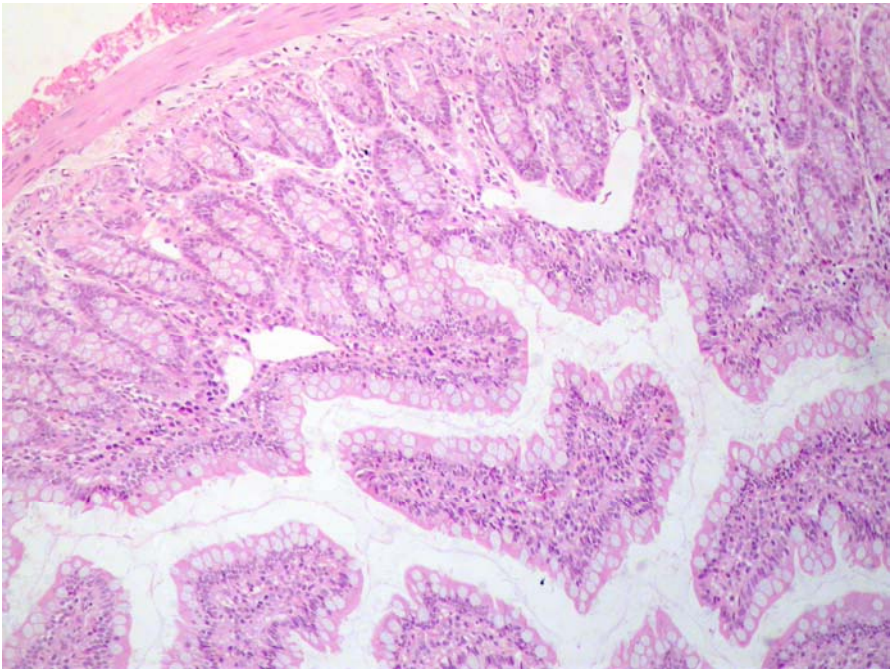
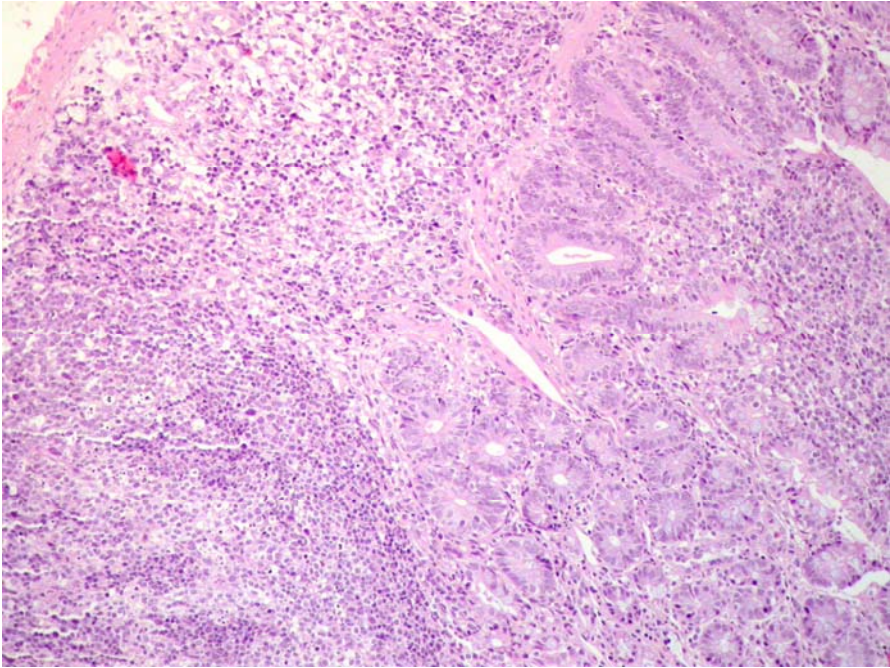
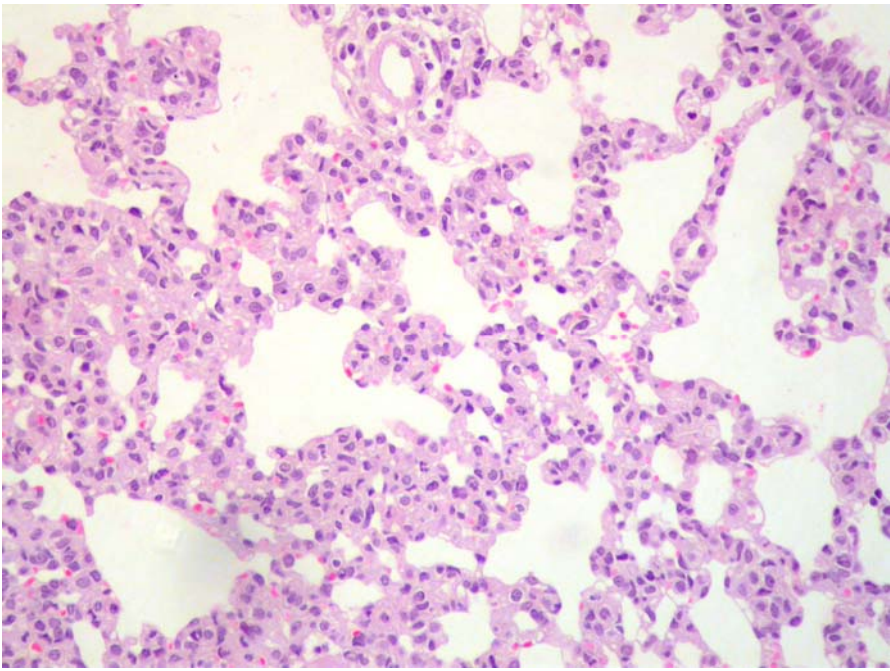
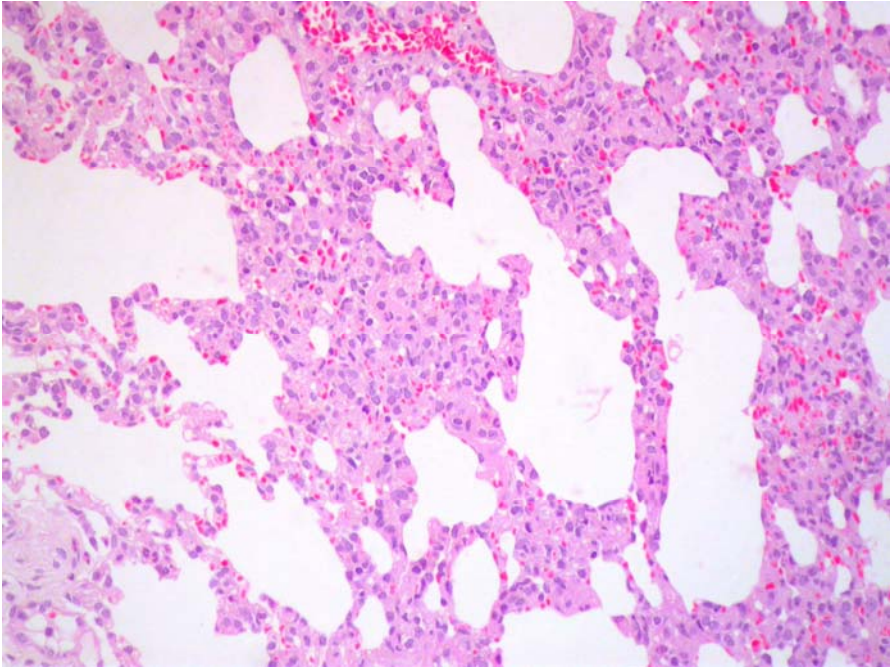


Figure 3 - Protein carbonyls content in major organs associated with septic response. Rats were sham-operated or submitted to cecal ligation and puncture (CLP). CLP animals were assigned to receive “basic support”, RC-3095 with “basic support”, or only saline as described under “Material and Methods”. 24 hours after CLP the heart, ileum, liver, lung and kidney were removed to the determination of protein carbonyls content as described under “Material and Methods”. Values are expressed as means \pm S.D. (n=6 each group).

* different from sham-operated, $p < 0.05$

** different from CLP, $p < 0.05$





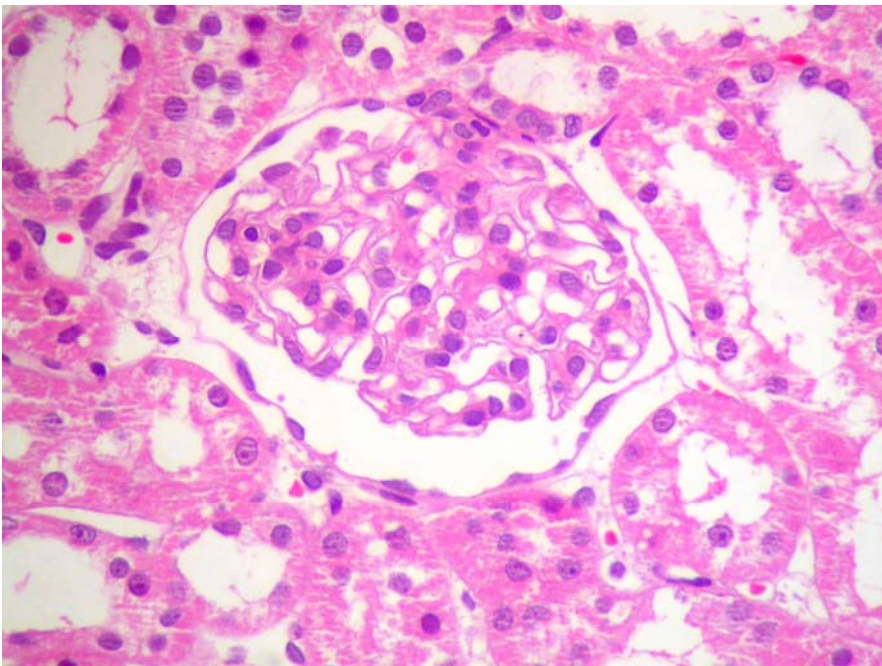
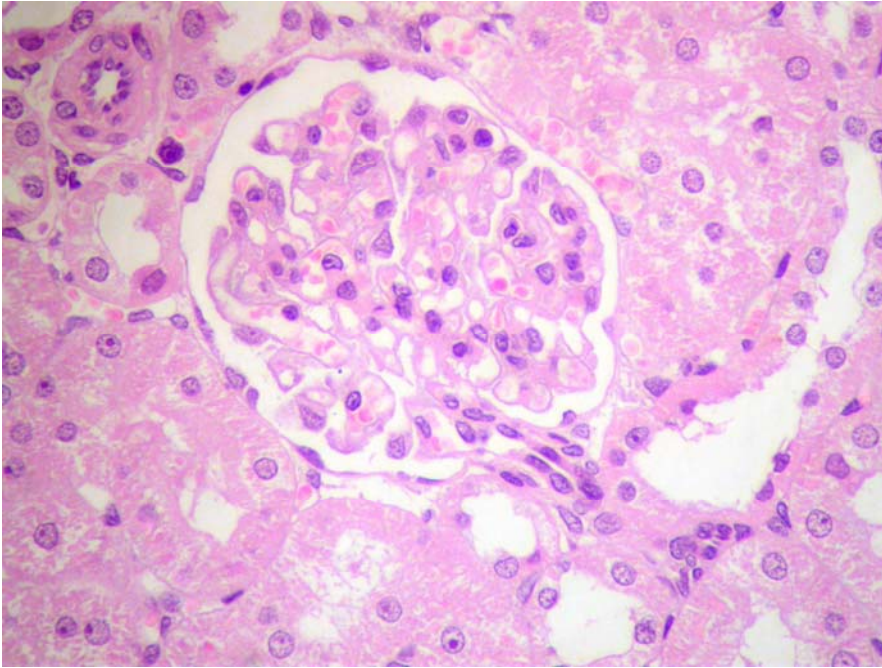


Figure 4 - Histopathologic findings 24hs after cecal ligation and puncture (CLP). Rats were submitted to CLP and assigned to receive “basic support” or RC-3095 with “basic support” as described in Materials and Methods. 24hs after CLP the heart (not shown), ileum (A and B), liver (not shown), lung (C and D) and kidney (E and F) were removed for histopathologic analyses as described in Materials and Methods. Representative illustrations (n= 3). A, C and E rats submitted to CLP that

receive "basic support". B, D and F rats submitted to CLP that receive "basic support" plus RC-3095. (Hematoxylin and eosin X 400).

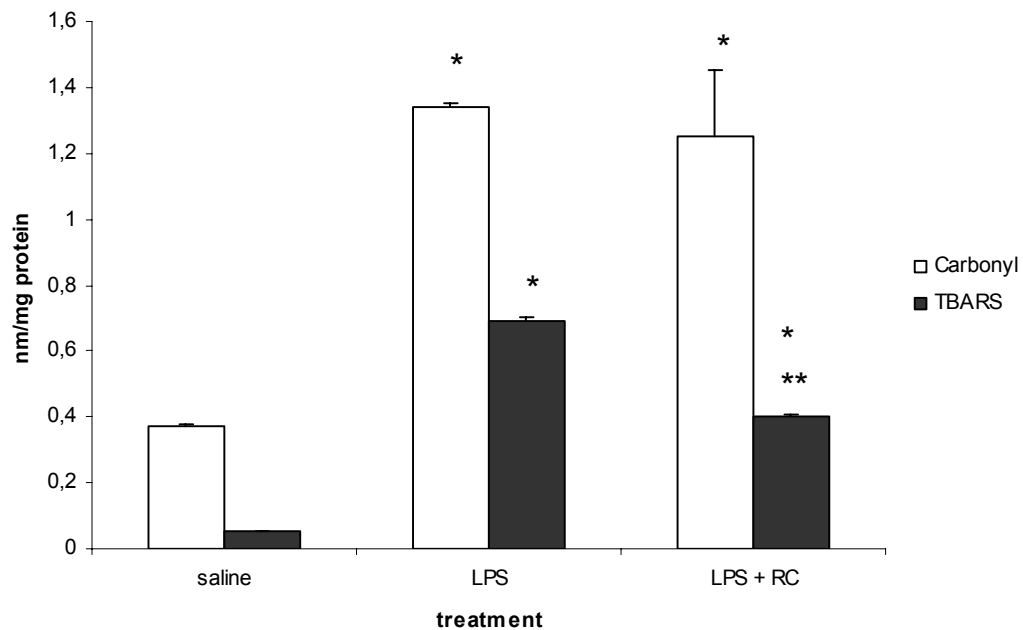


Figure 5 - Protein carbonyls and thiobarbituric acid reactive species content in the lung after acute lung injury induced by LPS. Rats were exposed to LPS or saline and treated with RC-3095 as described under “Material and Methods”. 24 hours after acute lung injury induction the lung was removed to the determination of protein carbonyls and thiobarbituric acid reactive species content as described under “Material and Methods”. Values are expressed as means \pm S.D. (n=6 each group).

* different from saline, $p < 0.05$

** different from LPS, $p < 0.05$

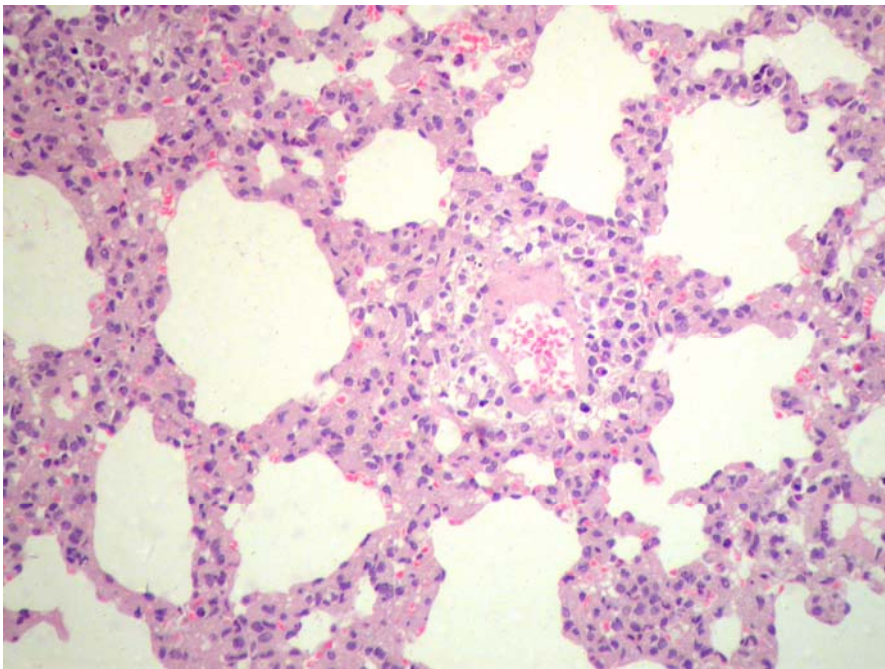
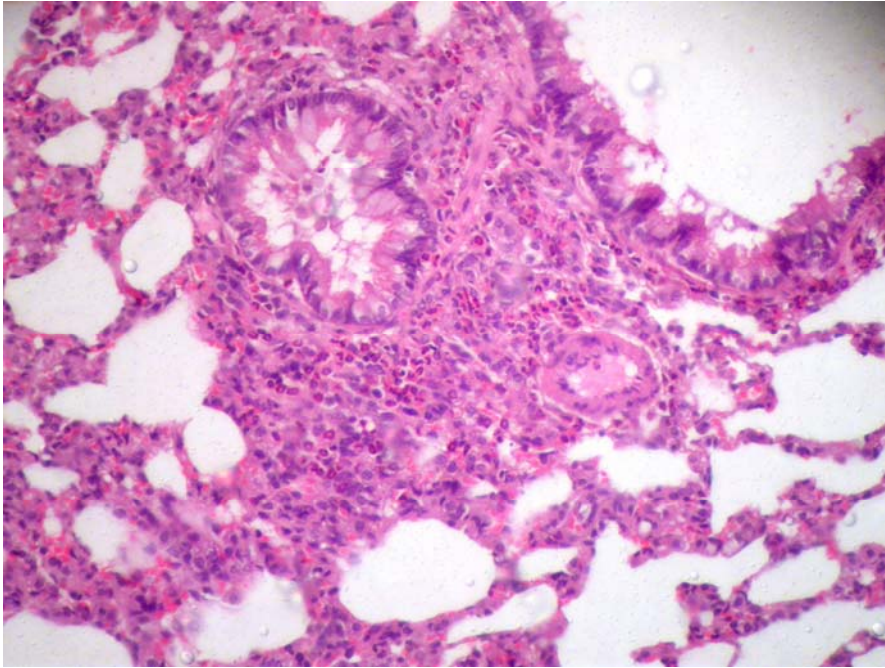


Figure 6 - Histopathologic findings 24hs after acute lung injury induced by LPS. Rats were exposed to LPS or saline and treated with RC-3095 as described under “Material and Methods”. 24 hours after acute lung injury induction the lung was removed for histopathologic analyses as described in Materials and Methods. Representative illustrations (n= 3). (Hematoxylin and eosin X 400).

TERCEIRA PARTE

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

O antagonista do Peptídeo Liberador de Gastrina inibe a secreção de TNF- α e IL-1 β e aumenta a sobrevida em modelo de sepse experimental

Felipe Dal-Pizzol¹, Luciane Pons Di Leone², Cristiane Ritter¹, Márcio Rodrigo Martins¹, Adalisa Reinke¹, João Rocha¹, Rafael Roesler³, and Gilberto Schwartzmann²

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, UNESC, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

e-mail: pizzol.ez@terra.com.br.

²Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas e Departamento de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

³Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

Os autores estudaram os efeitos na via do novo inibidor sintético da bombesina/peptídeo liberador de gastrina (GRP), RC-3095, em um modelo experimental de sepse através da ligação cecal e perfuração (CLP), e no dano pulmonar agudo (ALI) em ratos Wistar. Inicialmente foram estudados os efeitos do RC-3095 na mortalidade geral dos animais tratados e nos controles. Amostras de tecido foram coletadas dos animais tratados e dos controles para avaliação de dano tecidual, através da análise histopatológica convencional, bem como, para estudos de dano oxidativo. Macrófagos peritoneais foram preparados a partir de secreções peritoneais recém isoladas de ratos Wistar. Para o isolamento de macrófagos, células peritoneais secretadas em meio RPMI-1640 complementadas com 2% de soro bovino fetal inativado pelo calor foram cultivadas em placas de Petri. A seguir, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI-1640 complementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor por mais quatro horas. Após esse período, os macrófagos isolados do rato normal foram expostos a LPS e então destinados a RC-3095 (1 µg/ml ou 10 µg/ml) ou não, para a determinação de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Macrófagos isolados de animais expostos a CLP foram cultivados e tratados com ou sem RC-3095, para determinação de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Nossos resultados mostraram que o RC-3095 reduz a mortalidade dos ratos Wistar em modelo de CLP e ALI. Este efeito está associado com a diminuição do dano tecidual, como observado pelos estudos histopatológicos convencionais, e pelas medidas de dano oxidativo tecidual. Os efeitos acima descritos podem ser explicados, pelo menos parcialmente, pela inibição da secreção de TNF- α e IL-1 β pelos

macrófagos, os quais podem interferir em vários processos relacionados à progressão da sepse. Notavelmente, o RC-3095 não modulou a secreção de IL-10, sugerindo que a via intracelular modulada pela bombesina/GRP é seletivo para citoquinas pró-inflamatórias.

INTRODUÇÃO

O choque séptico constitui a causa mais freqüente de morbidade e mortalidade em unidades de tratamento intensivo (1). O tratamento da sepse consiste em medidas de suporte, como ventilação mecânica, reposição volêmica generosa e drogas vasopressoras no controle da pressão sangüínea, juntamente com a ênfase no uso de antimicrobianos e na erradicação dos focos de infecção. Apesar dos significativos avanços nas terapias disponíveis e do melhor entendimento de sua patogênese, a mortalidade decorrente do choque séptico não mostrou melhora significativa no índice de mortalidade (2).

Embora normalmente desencadeada por uma infecção, a fisiopatologia da sepse é caracterizada por um estímulo excessivo da resposta inflamatória sistêmica, que pode evoluir para a falência múltipla de órgãos (3). O uso clínico de terapias antiinflamatórias não tem conseguido demonstrar melhoras clínicas em pacientes criticamente doentes (4).

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seus neuropeptídeos relacionados regulam diversas funções do sistema nervoso central (SNC) (5). Além de sua ação neuromoduladora, os neuropeptídeos podem estar envolvidos em diversos transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia e o autismo (6-8). Além disso, os neuropeptídeos parecem apresentar algum efeito na regulação da resposta imune (9). Observou-se que peptídeos bombesina similares estimulavam a proliferação de vários modelos tumorais *in vitro* (10). O GRP, como estimulador ou inibidor, regula várias atividades das células imunes, como os linfócitos, os

fagócitos e as células *natural killer* (11-14). O peptídeo liberador de gastrina (GRP) parece apresentar um efeito estimulante na mobilidade, ingestão e produção de superóxidos em macrófagos de ratos adultos (15, 16). O GRP potencializou a liberação de IL-1 pelos macrófagos alveolares ativados pela presença de lipopolissacarídeo (LPS) (17). Tais reações de atividade no sistema imune são, ao menos em parte, mediadas diretamente pela ativação da proteína quinase C (18). Sendo assim, o GRP parece estar envolvido na patogênese de algumas condições inflamatórias, como bronquite crônica (19) e fibrose pulmonar (20).

O potencial terapêutico desses mecanismos para melhorar a sobrevida nas condições inflamatórias, como a sepse, é desconhecido. Neste estudo, observamos que o antagonista do receptor do tipo bombesina, fator de liberação da gastrina, RC-3095 (D-Tpi6, Leu13 psi[CH₂NH]-Leu14) diminuiu a liberação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) dos macrófagos. *In vivo*, o tratamento com o RC-3095 atenuou os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β e aumentou a sobrevida em sepse estabelecida, mesmo quando o tratamento foi iniciado após o início da infecção. Além disso, o RC-3095 diminuiu o dano pulmonar causado pela aplicação intratecal de LPS em um modelo estabelecido de lesão pulmonar aguda (ALI). Estes resultados dão suporte de inibição do receptor do GRP como uma estratégia antiinflamatória para o tratamento da sepse e da lesão pulmonar aguda.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos *in vivo* foram realizados de acordo com as normas do Instituto Nacional de Saúde americano (NIH) e com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

a) Modelo de ligação cecal e perfuração (CLP)

Como previamente descrito (21), para o presente estudo, foram utilizados ratos Wistar, do sexo masculino, com idade média de 2 a 3 meses, submetidos a ligação cecal e perfuração (CLP). Para a anestesia, foi utilizada uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. Em condições assépticas, foram realizadas a laparotomia e a perfuração do ceco, com tamanho padronizado de 3 cm na linha média. O ceco foi ligado com fio de polipropileno 3.0 logo abaixo da válvula ileo-cecal e perfurado com agulha 14. O ceco foi cuidadosamente pressionado para liberar seu conteúdo fecal para a cavidade peritoneal. Posteriormente, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal e realizou-se a sutura da pele com fio monofilamentar 4.0, com pontos simples. Neste modelo de sepse, os ratos desenvolvem bacteremia pela exposição de organismos entéricos gram-negativos (22).

Para os propósitos de medidas bioquímicas, 24 ratos foram infectados por CLP. Os animais foram divididos em 4 grupos: 1 – operação simulada, 2 - ligação

cecal e perfuração (CLP); 3 – ligação cecal e perfuração (CLP) mais tratamento de suporte (50 ml/kg de solução salina após 6 e 12h após CLP associada à administração de 30 mg/kg de ceftriaxona sc e 25 mg/kg de clindamicina sc, a cada 6 horas, por 3 dias, começando 6 horas após a CLP) e 4 – mesmo tratamento do grupo 3, associado à administração de 5 mg/kg de RC-3095 uma vez ao dia, por 2 dias, iniciando 6 horas após a CLP. Foram coletadas amostras de sangue da veia caudal 3 e 12 horas após a CLP com a intenção de determinar os marcadores bioquímicos plasmáticos (veja abaixo). Vinte e quatro horas após a administração do tratamento, os ratos foram mortos por decapitação, seguida da captura de amostras de sangue (por punção cardíaca). O pulmão, fígado, rim, coração e íleo foram retirados e imediatamente armazenados a uma temperatura de -70°C até a realização da medida de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da formação da carbonil proteína (como parâmetro de dano oxidativo) ou sua fixação para posterior análise histopatológica (veja abaixo).

Como parâmetro de estresse oxidativo, foram usadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante a reação de aquecimento por ácido, como previamente descrito.

Em resumo, a amostra foi misturada com ácido tricloroacético a 10% e ácido tiobarbitúrico a 0,67% (Sigma Chemical, St. Louis, MO) e a seguir aquecida, imersa em água fervente por 15 minutos. O TBARS foi determinado pela absorção de 535 nm por meio de 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados estão expressos como equivalentes de malondialdeído por miligrama

de proteína (método de Lowry). Além disso, determinamos os danos oxidativos às proteínas, conforme descrito anteriormente. Em síntese, as proteínas foram precipitadas pela adição de 20% de ácido tricloroacético e redissolvidas em dinitrofenil-hidrazina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) e a absorção foi lida a 370nm.

Níveis séricos TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram determinados 24 horas após o CLP por ELISA com *kits* disponíveis comercialmente (R&D systems, Minneapolis, MN). Marcadores séricos de danos aos órgãos (AST, ALT, uréia, creatinina, amilase, lipase) foram determinados 3, 12 e 24 horas após CLP por meio de *kits* disponíveis comercialmente (Labtest, São Paulo, Brasil). Todas essas análises foram realizadas por investigadores cegos ao tratamento. Para a análise histopatológica após a fixação, tecidos de fígado cortados foram colocados em parafina e então cotidianamente coloridos com hematoxilina e eosina. Um patologista cego experiente realizou a análise histopatológica.

Como parâmetro de translocação bacteriana intestinal, os gânglios linfáticos mesentéricos de cada animal foram coletados e homogeneizados. Diluições em série de dez vezes dos homogenados foram semeadas em placas de ágar sangue e incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias que surgiram foram contadas para determinar o número de bactérias por grama de gânglio linfático.

A sobrevida foi testada em um grupo separado de animais. Em um primeiro protocolo, os animais expostos a CLP foram escolhidos aleatoriamente para receber RC-3095 uma hora antes (n=22) ou uma hora após a indução de CLP sem “suporte básico”. Em uma segunda série de experimentos, o efeito de RC-

3095 com “suporte básico” foi analisado para quanto a uma prática clínica mais assemelhada. Os animais foram estimulados com CLP e com “suporte básico” (n=32) (salina sc a 50ml/kg 6 horas e 12 horas após CLP mais ceftriaxona sc a 30mg/kg e clindamicina sc 25mg/kg a cada 6 horas por três dias, com início 6 horas após CLP). Em todos esses experimentos, um grupo submetido a operação simulada e um grupo CLP sem tratamento foram incluídos para comparação. A mortalidade dos animais foi registrada durante dez dias.

b) Modelo ALI (lesão pulmonar aguda)

Ratos de Wistar machos adultos com peso aproximado entre 250 a 300g foram usados neste estudo. Os ratos foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e ARDS foi induzida por instilação intratecal de LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma Chemical, St. Louis, MO) a uma dosagem de 100µg/100g de peso corporal.

Doze horas após a instilação de LPS, os ratos foram mortos e uma lavagem broncoalveolar (BAL) foi realizada, conforme descrito. O fluido BAL (BALF) foi centrifugado (1000 g por 10 min) e o sobrenadante sem células resultante foi analisado segundo parâmetros bioquímicos diferentes (veja abaixo). A membrana celular foi usada para determinar a contagem total de células e o diferencial (veja abaixo). Em um grupo separado de animais, induziu-se ARDS, como descrito anteriormente, para isolar o tecido pulmonar. Doze horas após a instilação de LPS, os ratos foram mortos e as amostras do pulmão, isoladas e imediatamente armazenadas a -70°C até serem avaliadas por parâmetros de estresse oxidativo

ou fixadas em solução de formalina a 4% para análise histopatológica, como descrito anteriormente.

Os animais foram divididos em três grupos: 1 – instilação de salina isotônica, grupo 2 – ALI tratada com salina, grupo 3 – ALI tratada com RC-3095 (5 mg/kg, sc 3 horas após ALI) (n=36). Para estimar o grau de lesão celular alveolar e a membrana capilar alveolar, a contagem total de células BALF comprometidas e o diferencial, determinaram-se a proteína BALF e o conteúdo de LDH. As células BALF foram avaliadas usando-se uma câmara de Neubauer colorida com corante azul Giemsa ou Trypan. O conteúdo de proteína total BALF foi determinado pelo método de Lowry. O conteúdo de LDH total de BALF foi determinado usando um espectrofotômetro por meio de *kits* disponíveis comercialmente (LabTrade, Brasil).

c) Liberação por macrófagos de TNF- α , IL-1 β e IL-10

Macrófagos peritoneais foram preparados a partir de secreções peritoneais recém isoladas de ratos de Wistar (rato normal ou rato quatro horas antes de CLP). Para o isolamento de macrófagos 2×10^7 , células peritoneais secretadas em 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) complementado com 2% de soro bovino fetal inativado pelo calor foram cultivadas em placas de Petri por 60 minutos a 37°C (ref CCM). A seguir, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI-1640 complementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor por mais quatro horas. Após esse período, os macrófagos isolados do rato normal foram expostos a LPS (100ng/ml por 4h) e então destinados a RC-3095 (1 μ g/ml ou 10 μ g/ml) ou não. Após seis horas, o meio foi recoberto para a

determinação de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Macrófagos isolados de animais expostos a CLP foram cultivados como descrito anteriormente e tratados com ou sem RC-3095 por seis horas. Após esse período, o meio foi recoberto para a determinação de TNF- α , IL-1 β e IL-10.

RESULTADOS

a) Antagonista GRP modula TNF- α e IL-1 β , mas não IL-10, liberação de macrófago

Estimulamos culturas primárias de macrófagos peritoneais de ratos com endotoxina e tratamo-las com RC-3095. O antagonista GRP atenuou o TNF- α induzido por LPS e o acúmulo de IL-1 β nos meios de cultura de macrófagos. Esse efeito foi mais pronunciado a 10 μ g/ml (Tabela 1), mas era evidente a 1 μ g/ml (dados não mostrados). O antagonista GRP não interferiu na liberação da citocina antiinflamatória IL-10 em ambas as dosagens estudadas (dados não mostrados). Esses resultados eram semelhantes quando macrófagos peritoneais dos ratos CLP foram estudados. A liberação de TNF- α e IL-1 β , mas não de IL-10, por macrófagos ativados por CLP foi atenuada, com uma inibição máxima de 50% a uma concentração de 10 μ g/ml (Tabela 1). RC-3095 a 1 μ g/ml também atenuou TNF- α e IL-1 β liberada por macrófagos ativados por CLP (dados não mostrados).

b) Tratamento por antagonista GRP melhora a sobrevida em sepse experimental

Para determinar se o tratamento com RC-3095 poderia atenuar os níveis de TNF- α e IL-1 β circulantes durante a sepse, realizamos CLP, um modelo animal clinicamente relevante para a sepse humana por causar peritonite letal produzida por uma infecção polimicrobiana (21). Iniciamos o tratamento seis horas após a

indução da sepse, quando o rato demonstrava sinais claros de sepse. Essa administração adiada de RC-3095 atenua os níveis de TNF- α e IL-1 β circulantes 24 horas após a indução de sepse (Tabela 2).

Conforme demonstrado na liberação de IL-10 de macrófagos, RC-3095 não modulou os níveis de IL-10 circulante durante a sepse (dados não mostrados). Essa administração adiada de RC-3095 melhorou significativamente a sobrevivência quando administrada com suporte básico (Figura 1). A administração de RC-3095 seis horas após CLP uma vez ao dia por um dia não melhorou a taxa de mortalidade, em comparação com o “suporte básico” (dados não mostrados), mas o efeito protetor foi acentuado em animais que receberam RC-3095 uma vez ao dia por dois dias (Figura 1). A administração de RC-3095 uma hora antes ou uma hora após CLP sem suporte básico melhorou significativamente a taxa de sobrevivência em cerca de 50% (dados não mostrados). Esses efeitos protetores provavelmente estavam relacionados à atenuação do dano no pâncreas (conforme avaliado por níveis de amilase circulatória), no fígado (conforme avaliado por níveis de AST circulatória e ALT) e, em menor grau, no rim (conforme avaliado por níveis circulatórios de uréia e creatinina) (Tabela 2).

O tratamento com RC-3095 atenuou o dano oxidativo em vários órgãos associados à resposta séptica, conforme avaliado pelos níveis de TBARS e carbonil proteína (Figuras 2 e 3). Esse efeito foi mais pronunciado no rim, íleo e coração (Figuras 2 e 3). O tratamento com RC-3095 conseguiu atenuar algumas das alterações histopatológicas constatadas na observação microscópica ótica. O antagonista GRP diminuiu a infiltração inflamatória ileal (Figura 4A e 4B), o edema alveolar e a infiltração inflamatória (Figura 4C e 4D) e a ocorrência leve de

necrose tubular renal (Figura 4E e 4F). A proteção contra dano ileal também foi evidenciada pela redução para um terço da contagem de bactérias nos gânglios linfáticos mesentéricos (dados não mostrados).

c) tratamento com antagonista GRP atenua o dano em lesão pulmonar aguda experimental

Para determinar os efeitos do RC-3095 em outros modelos animais de doenças inflamatórias, realizamos estudos em um modelo experimental de ALI induzida por LPS. O tratamento com RC-3095 após indução de ALI protege parcialmente o parênquima pulmonar contra o dano oxidativo induzido por LPS (Figura 5). Antagonista GRP atenuou a infiltração inflamatória alveolar e a secreção alveolar induzida por LPS (Figura 6A e 6B). Essas descobertas foram embasadas pelo conteúdo BALF de células inflamatórias, LDH e conteúdo da proteína (Tabela 3). A administração de RC-3095 reduziu o conteúdo de células inflamatórias total BALF (Tabela 3) e a secreção de proteína (Tabela 3). Além disso, o tratamento com RC-3095 diminuiu o conteúdo de LDH BALF (como parâmetro de lesão celular alveolar) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Relatamos aqui os efeitos benéficos do antagonista receptor GRP/bombesina seletivo, RC-3095, em um modelo bem-estabelecido para sepse experimental e lesão pulmonar aguda (22). Essa abordagem pode proporcionar vantagens a serem exploradas para o tratamento de distúrbios inflamatórios. O RC-3095 modula a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) por macrófagos ativados, o que leva a uma diminuição do dano oxidativo, da infiltração inflamatória e da disfunção orgânica, de modo a melhorar a mortalidade em um modelo de sepse clinicamente relevante.

Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que o GRP exerce uma modulação significativa sobre os diferentes passos da ativação de macrófagos *in vitro* e *in vivo* (9,12,13). No entanto, não se sabe se esta estratégia farmacológica poderia ser usada *in vivo* para melhorar a sobrevivência na sepse. Embora pareça que a resposta inflamatória esmagadora seja central para a patogênese do choque séptico, estratégias antiinflamatórias atualmente utilizadas têm um efeito clínico limitado na sepse e em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (4). Isso poderia ser devido a diversos fatores, dentre os quais a resposta inflamatória heterogênea associada a essas condições (3) e o delineamento enganoso de estudos pré-clínicos (23,24).

Em nosso estudo, demonstramos que o RC-3095 inibe a liberação de macrófagos de TNF- α e IL-1 β , o que poderia bloquear muitos processos associados à progressão da sepse. É interessante observar que o RC-3095 não

modula a liberação de IL-10 antiinflamatória, o que sugere que o caminho intracelular modulado por bombesina/GRP é seletivo para citocinas pró-inflamatórias. Algumas das ações da bombesina/GRP parecem envolver a ativação de PKC (18). Os efeitos quimicamente atrativos do GRP sobre macrófagos e linfócitos peritoneais murídeos são ao menos em parte mediados pela ativação de PCK (18). Os efeitos da bombesina, um homólogo do GRP, sobre a expressão COX-2 em linhas celulares intestinais exigem um aumento em $[Ca^{+2}]$, a ativação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK)-1 e -2 e p38MAPK e uma maior ativação e expressão dos fatores de transcrição Elk-1, ATF-2, c-Fos e c-Jun (25).

As espécies reativas de oxigênio exibem propriedades pró-inflamatórias pertinentes ao choque séptico (26-28). Além de seus efeitos pró-inflamatórios, ROS possuem vários mecanismos citotóxicos e induzem a ativação da enzima nuclear poli (adenosina 5'-difosfato-ribose) polimerase, a depleção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e adenosina trifosfato, o que leva a dano celular irreversível, conforme evidenciado no choque séptico (29). Os antioxidantes inibem a liberação de TNF, a ativação de citocinas pró-inflamatórias, a apoptose e a necrose celular (30).

Neste estudo, o RC-3095 conseguiu atenuar o dano oxidativo em vários órgãos associados à resposta à sepse e ao dano oxidativo em ALI. Além disso, o RC-3095 conseguiu atenuar a infiltração inflamatória e a translocação bacteriana intestinal. Esses efeitos poderiam ser, em parte, responsáveis pelos efeitos protetores demonstrados. O RC-3095 não parece ter demonstrado efeitos antioxidantes ou antibióticos diretos (dados não mostrados).

Sabe-se pouco sobre os efeitos fisiológicos do GRP na função imune e a possibilidade de explorar essas funções quanto à abordagem farmacológica das condições inflamatórias. Nossos resultados sugerem que o RC-3095 pode inibir a liberação de TNF- α e IL-1 β de macrófagos ativos, o que poderia representar um alvo farmacológico possível para controlar a inflamação sistêmica. Em diferentes modelos animais de condições inflamatórias, o RC-3095 conseguiu atenuar o dano e melhorar a taxa de sobrevivência. Até o ponto em que sabemos, este é o primeiro relato de um efeito protetor de um antagonista bombesina/GRP em sepse experimental. Justifica-se uma investigação mais aprofundada para determinar os caminhos intracelulares associados a esses efeitos, o papel exato do GRP na resposta imune e a possível utilização clínica de antagonistas bombesina/GRP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sands KE, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278, 234-240.
2. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998; 26: 2078-2086.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 2003; 348: 138-150.
4. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 1197-1205.
5. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 2002; 7:113–7.
6. Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, et al. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3_ to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1241–50.
7. Mellar CA, Henriques JAP, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides* 25 2004; 585–588.
8. Schwartzmann, G. *et al. Lung Cancer* 2004 46(1); 129.

9. Genton L, Kudsk KA. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *American Journal of Surgery* 2003; 186: 253–258
10. 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: 601–611.
11. Medina S, Del Rio M, Vctor VM, Hernanz A, De la Fuente M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. *Mechanisms of Ageing and Development* 1998; 102: 249-261.
12. Medina S, Del R.o M, De la Cuadra B, Guayerbas N, De la Fuente M. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystokinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. *Neuropeptides* 1999; 33: 173-179.
13. De la Fuente, M., Del Rio, M., Ferrandez, M.D., and Hernanz, A., Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991; 73: 205-211.
14. Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente M. 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: 549-555.
15. De la Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sciences* 2000; 67: 2125-2135.

16. De la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991; 73: 205-211.
17. Lemaire I. Bombesin-related peptides modulate interleukin-1 production by alveolar macrophages. *Neuropeptides*. 1991; 20: 217-223.
18. Del Rio M, De la Fuente M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. *Regul Pept*. 1994; 49:185-193.
19. Meloni F, Bertolotti R, Corsico A, Di Fazio P, Cecchetti M, Gialdroni-Grassi G. Bombesin/gastrin releasing peptide levels of peripheral mononuclear cells, monocytes and alveolar macrophages in chronic bronchitis. *Int J Tissue React*. 1992; 14: 195-201.
20. Lemaire I, Jones S, Khan MF. Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. *Neuropeptides* 1991; 20: 63-72.
21. Ritter C, Andrades M, Reinke A, et al: Treatment with *N*-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 342–349.
22. Roesler, R. *et al. Trends Pharmacol. Sci.* 2004 ; 25, 241-242.
23. Ritter, C. *et al. Lancet* 2004 ; 364, 498-499.
24. Polderman, K.H. *et al. Lancet* 2004; 363, 1721-1723.
25. Guo Y-S, Hellmich MR, Wen XD, Townsend CM. Activator Protein-1 Transcription Factor Mediates Bombesin-stimulated Cyclooxygenase-2 Expression in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 22941–22947.

26. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, et al: Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 685–692.
27. Fantone JC, Ward PA. A review: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395–418.
28. Ritter C, Andrades ME, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CTS, Menna-Barreto S, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Int Care Med* 2003; 29: 1782-1789.
29. Szabó C, Dawson VL. Role of poly(ADPribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 19: 287–298.
30. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. *N*-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992; 140: 390–399.

Tabela 1 - Marcadores bioquímicos séricos de dano no órgão e resposta inflamatória após CLP.

	CLP		BS		RC-3095	
	Tempo após CLP					
	12h	24h	12h	24h	12h	24h
Uréia (mg/dl)	48 ± 1.3	54 ± 2.1	47 ± 1.7	26 ± 0.6*	27 ± 0.9*	27 ± 0.5*
Creatinina (mg/dl)	0.3 ± 0.01	0,4 ± 0.03	0,4 ± 0.03	0,3 ± 0.01	0,2 ± 0.01	0,2 ± 0.02
TGO (UI/l)	418 ± 23	497 ± 31	425 ± 26	393 ± 32	276 ± 19*	301 ± 21*
TGP (UI/l)	87 ± 7	102 ± 12	102 ± 10	87 ± 9	59 ± 7*	52 ± 10
Amilase (UI/l)	3136 ± 100	2970 ± 99	2956 ± 129	2863 ± 131	2010 ± 102*	1900 ± 121*
TNF- α (pg/ml)	3400 ± 198	2600 ± 175	2100 ± 99*	1200 ± 102*	1130 ± 92**	1021 ± 102*
IL-1 α (pg/ml)	430 ± 41	338 ± 37	367 ± 44	201 ± 32*	209 ± 24*	178 ± 21*

CLP – grupo séptico (n=6)

BS – grupo séptico com terapia de suporte (n=6)

RC-3095 - grupo séptico com terapia de suporte mais RC-3095 (n=6)

* diferença do grupo CLP, p<0.05

** diferença do grupo BS, p<0.05

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos e celulares no BALF de ratos 12 após LPS intratecal

Grupo	Contagem Total de Células (x10⁵)	Proteína Total	Atividade LDH (U/l)
Controle	51 ± 3.4	40 ± 3.2	1.2 ± 0.1
LPS	500 ± 21*	78 ± 6.5*	16.2 ± 2.3*
LPS + RC	97 ± 4.6 **	37 ± 2.1	8.3 ± 1.2**

Controle – instilação salina (n=6)

LPS – dano pulmonar agudo induzido por LPS (n=6)

LPS + RC - dano pulmonar agudo induzido por LPS mais RC-3095 (n=6)

* diferença do controle, p<0.05

** diferença de LPS, p<0.05

Tabela 3 - TNF- α and IL-1 β liberados por macrófagos peritoneais isolados de rato normal exposto a LPS (100ng/ml) ou isolado de animais expostos a CLP tratados ou não com RC-3095 (10 μ g/ml).

	TNF- α	IL-1 β
M-LPS	1400 \pm 102	250 \pm 19
M-LPS + RC	540 \pm 86*	102 \pm 12*
M-CLP	1983 \pm 213	287 \pm 32
M-CLP + RC	890 \pm 123*	134 \pm 11*

M-LPS - macrófagos peritoneais isolados de rato normal exposto a LPS

M-LPS + RC - com M-LPS tratado com RC-3095

M-CLP - macrófagos peritoneais isolados de ratos CLP

M-CLP + RC - com M-CLP tratados com RC-3095

* diferente de M-LPS or M-CLP, $p < 0.05$

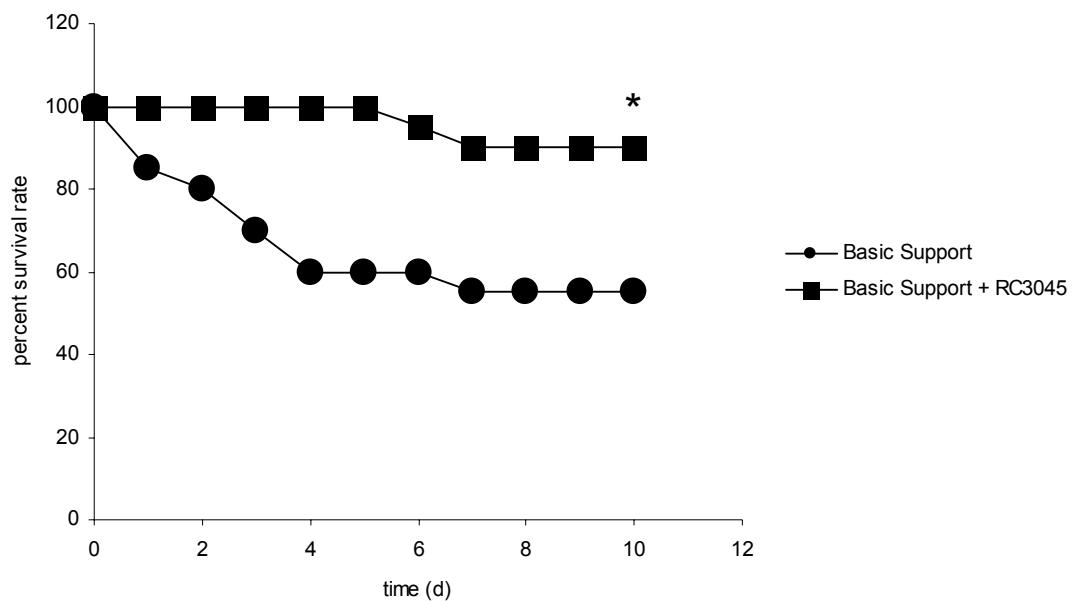


Figura 1 - O antagonista peptídeo liberador de gastrina (RC-3095) melhora a taxa de sobrevivência em sepse “estabelecida”. A sobrevivência foi analisada em ratos de Wistar submetidos a ligação cecal e perfuração. O tratamento com RC-3095 adiado iniciou 6 horas depois, passando a ser administrado uma vez ao dia por um ou dois dias. Os dados são mostrados como percentual de animais sobreviventes (n=32 no grupo 1 e n=40 no grupo 2; *p<0,01).

* diferente de submetidos à operação simulada, p<0.05

** diferente de CLP, p<0.05

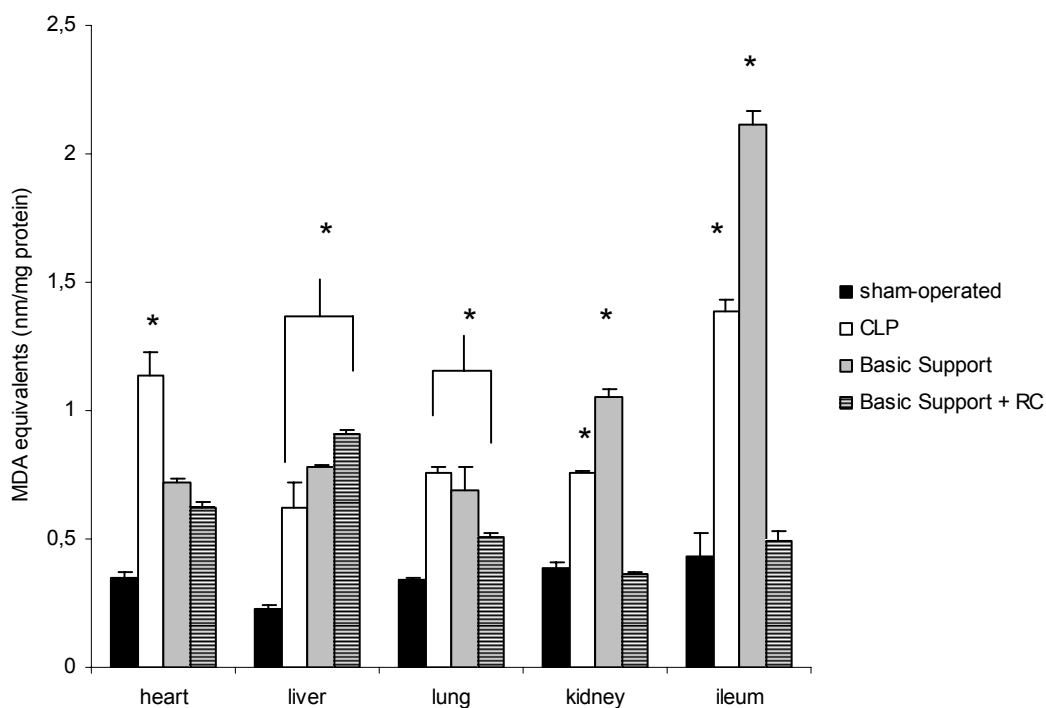


Figura 2 - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico contidas nos principais órgãos associados à resposta séptica. Os ratos foram submetidos à operação simulada ou à ligação cecal e perfuração (CLP). Os animais submetidos a CLP foram designados para receber “suporte básico”, RC-3095 com “suporte básico”, ou apenas salina, conforme descrito em “Material e métodos”. Vinte e quatro horas após CLP, o coração, o íleo, o fígado, o pulmão e o rim foram removidos para determinar as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico presentes, conforme descrito em “Material e métodos”. Os valores são expressos como média \pm S.D. (n=6 cada grupo).

* diferente de submetidos à operação simulada, $p < 0.05$

** diferente de CLP, $p < 0.05$

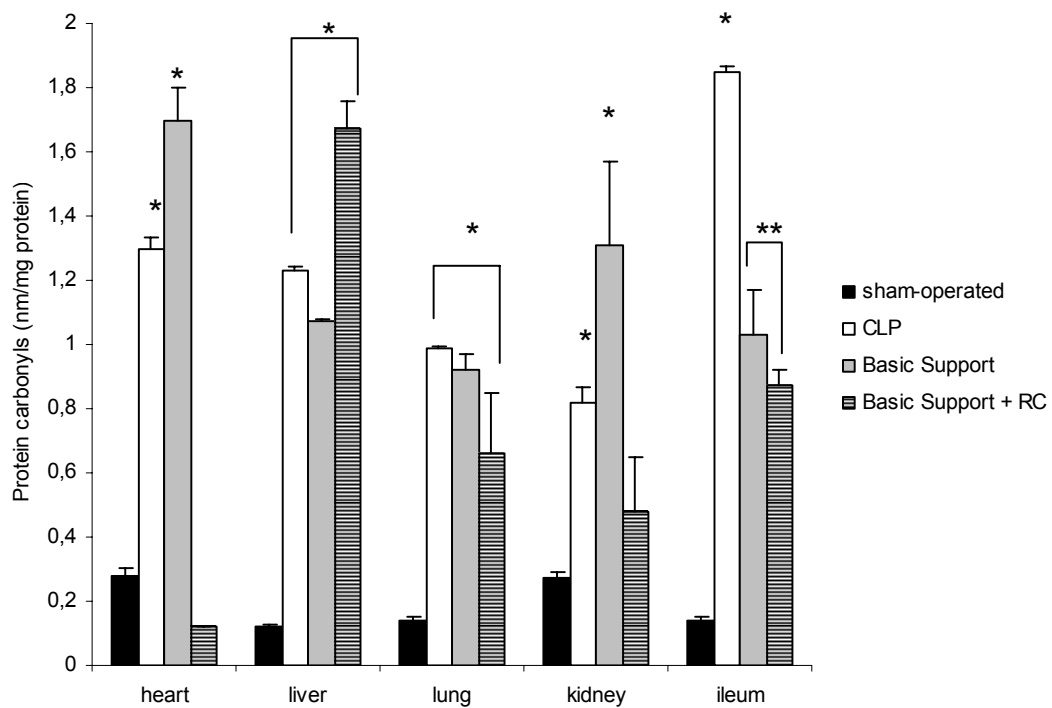
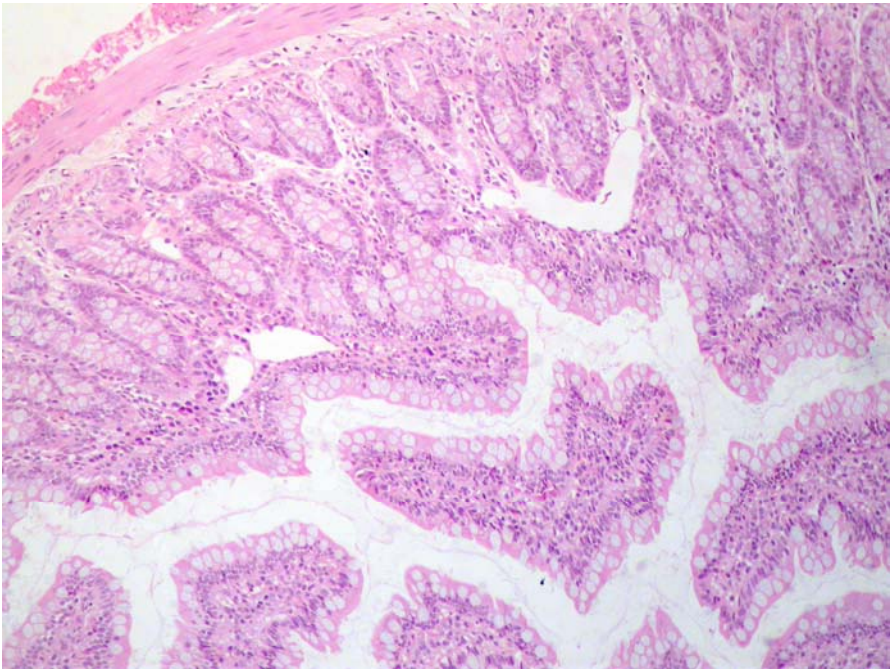
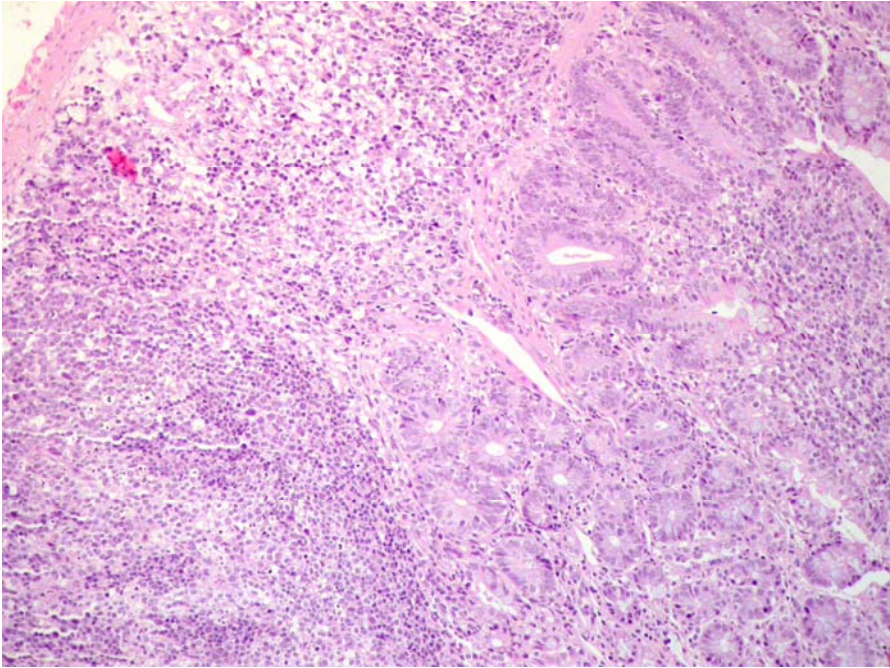
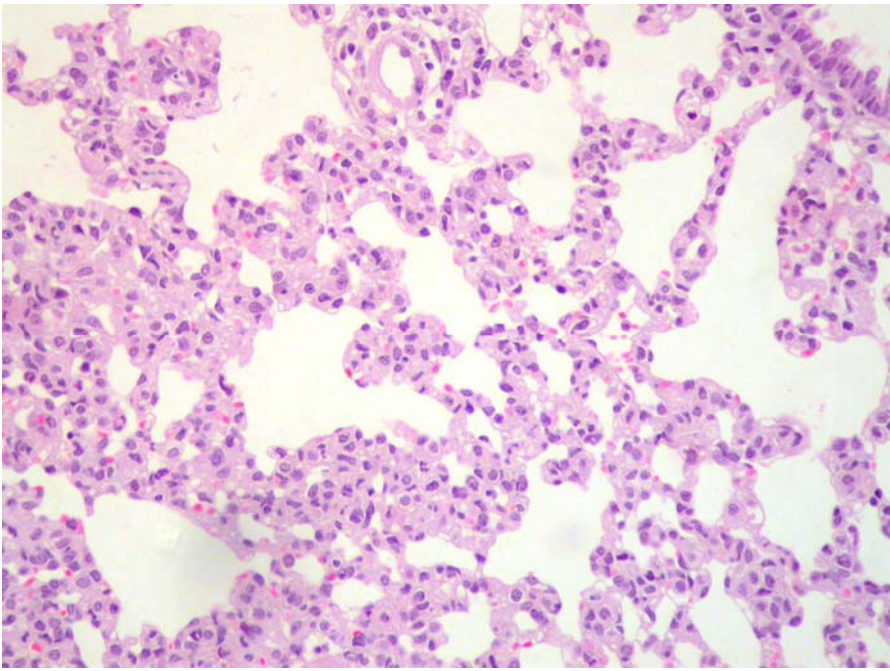
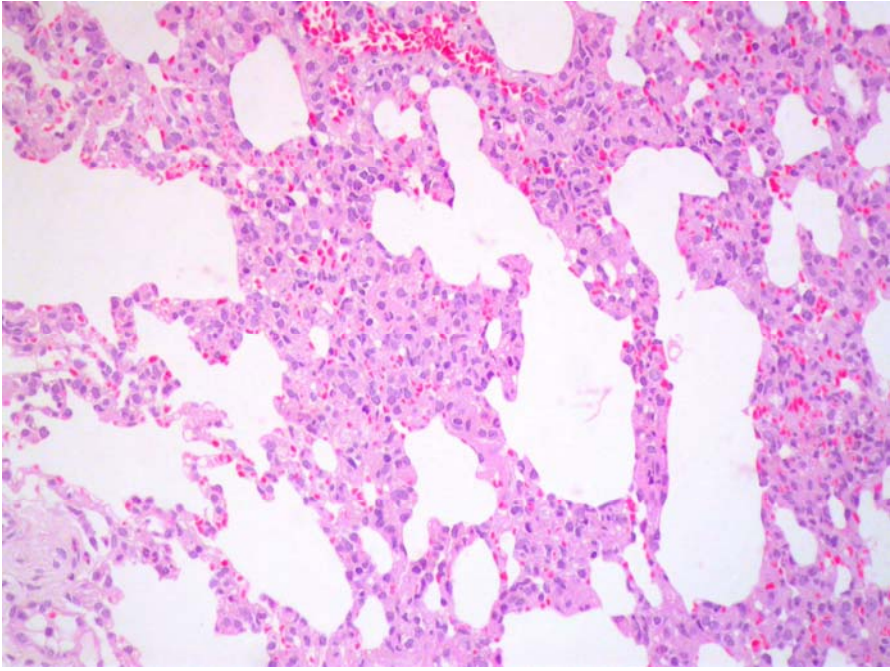


Figura 3 - Carbonil proteínas contidas nos principais órgãos associados à resposta séptica. Os ratos foram submetidos à operação simulada ou à ligação cecal e perfuração (CLP). Os animais submetidos a CLP foram designados para receber “suporte básico”, RC-3095 com “suporte básico” ou apenas salina, conforme descrito em “Material e Métodos”. Vinte e quatro horas após CLP, o coração, o íleo, o fígado, o pulmão e o rim foram removidos para determinar as carbonil proteínas contidas, como relatado em “Material e métodos”. Os valores são expressos como média \pm S.D. (n=6 cada grupo).

* diferente de submetidos à operação simulada, $p < 0.05$

** diferente de CLP, $p < 0.05$





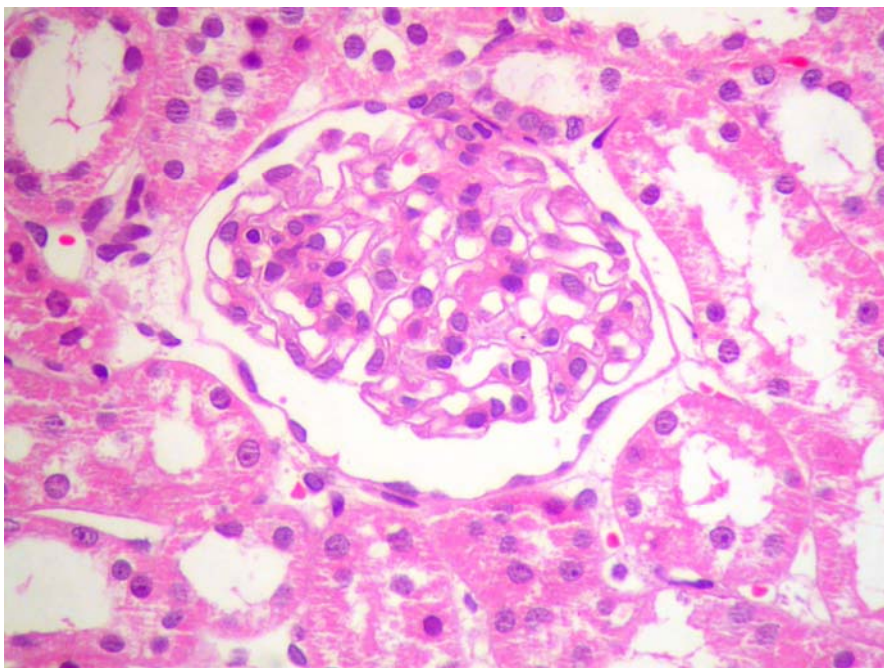
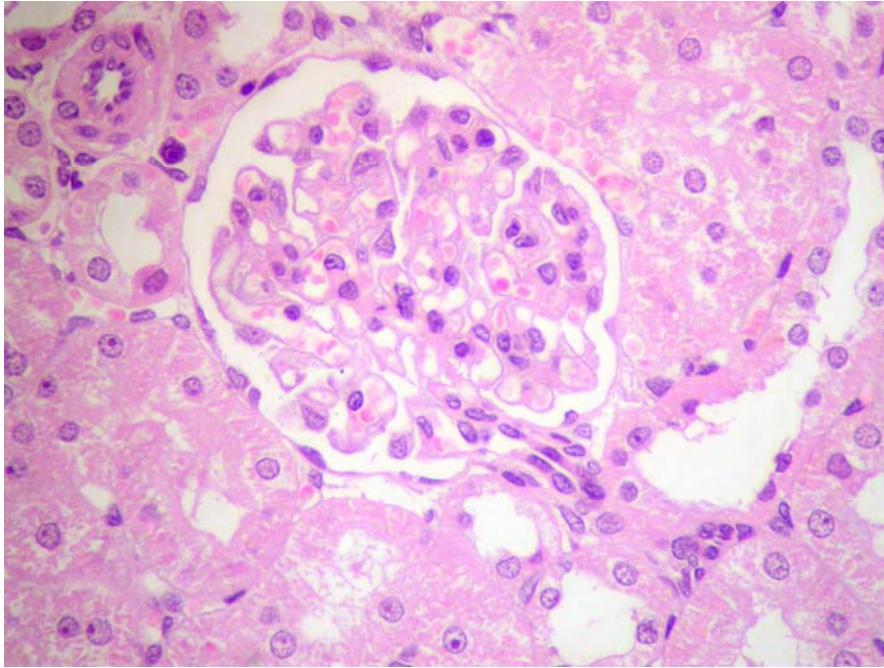


Figura 4 - Descobertas histopatológicas 24 horas após a ligação cecal e perfuração (CLP). Os ratos foram submetidos a CLP e designados para receber “suporte básico” ou RC-3095 com “suporte básico”, conforme descrito em “Material e métodos”. Vinte e quatro horas após CLP, o coração (não apresentado), o íleo (A e B), o fígado (não apresentado), o pulmão (C e D) e o rim (E e F) foram removidos para análise histopatológica, como relatado em “Material e Métodos”. Ilustrações representativas (n= 3). Os ratos A, C e E submetidos a CLP que

recebem “suporte básico”. Os ratos B, D e F submetidos a CLP que recebem “suporte básico” mais RC-3095. (Hematoxilina e eosina X 400).

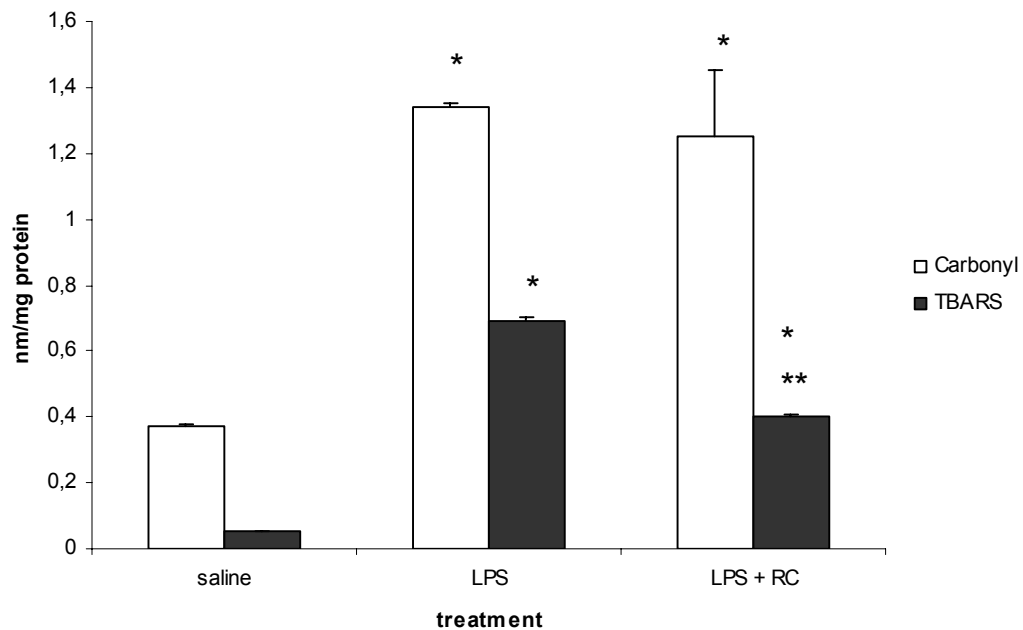


Figura 5 - Espécies reativas a carbonil proteínas e ácido tiobarbitúrico contidas no pulmão após lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Os ratos foram expostos a LPS ou salina e tratados com RC-3095, como descrito em “Material e Métodos”. Vinte e quatro horas após a indução de lesão pulmonar aguda, o pulmão foi removido para determinar as espécies reativas a carbonil proteínas e ácido tiobarbitúrico presentes, conforme relatado em “Material e Métodos”. Os valores são expressos como média \pm S.D. (n=6 cada grupo).

* diferente de salina, $p < 0.05$

** diferente de LPS, $p < 0.05$

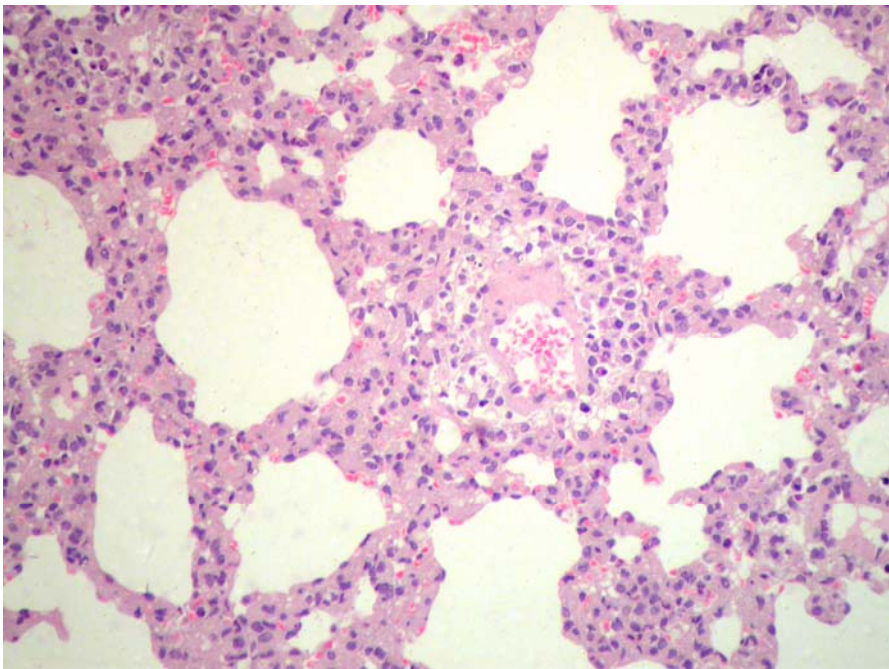
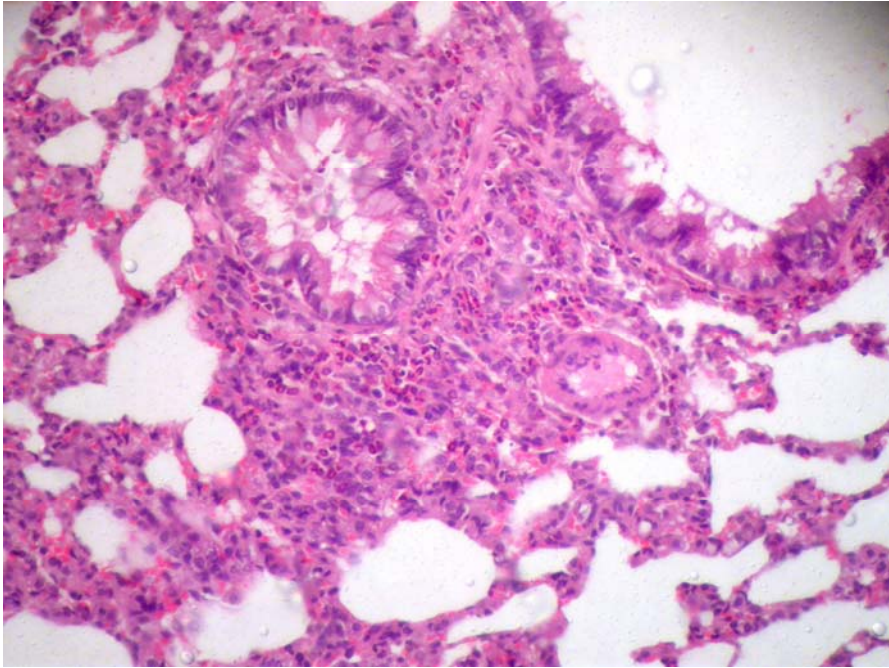


Figure 6 - Descobertas histopatológicas 24 horas após a lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Os ratos foram expostos a LPS ou salina e tratados com RC-3095, conforme descrito em "Material e métodos". Vinte e quatro horas após a indução de lesão pulmonar aguda, o pulmão foi removido para análise

histopatológica, como relatado em “Material e Métodos”. Ilustrações representativas (n= 3). (Hematoxilina e eosina X 400).

CONCLUSÕES

a) Conclusão Geral

A administração do RC-3095 reduz a secreção de TNF- α , IL-1 β , sem um efeito significativo nas concentrações de IL-10, em culturas de macrófagos peritoneais do rato após estimulação por endotoxina ou por CLP.

b) Conclusões Específicas

a. A administração de RC-3095 reduziu significativamente o dano oxidativo (avaliado por TBARS e carbonil) no rim, íleo, pulmão e coração.

b. A administração de RC-3095 reduziu os marcadores plasmáticos de dano pancreático, hepático e, em menor intensidade, renal.

c. A administração de RC-3095 reduziu a mortalidade em modelo animal de sepse.

d. A administração de RC-3095 reduziu o dano produzido por administração de LPS em modelo de injúria pulmonar aguda.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É maravilhoso poder participar de um projeto inovador, cujos resultados possam, quem sabe um dia, ser de utilidade para a humanidade. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo vem realizando de forma pioneira estudos com o antagonista de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina, o RC-3095, o que nos propiciou uma frutífera colaboração com vários grupos de pesquisa no país e no exterior. A colaboração com o Prof. Andrew Schally, Premio Nobel de Medicina, tem sido particularmente enriquecedora. Concluimos recentemente o primeiro estudo clínico com este agente em pacientes com neoplasias malignas avançadas. Estes resultados serão objeto de uma publicação submetida ao Journal of Clinical Oncology. O método análise do RC 3095 em amostras de plasma humano, por nos desenvolvido em colaboração com o grupo do Prof. Gilberto de Nucci, gerou um artigo que será publicado no Journal of Chromatography nos próximos meses. Nossa expectativa é que estes artigos receberão muita atenção no meio científico. Uma vez que esta via vem sendo também estudada por nosso grupo em modelos de doenças de sistema nervoso, aguardamos com muito interesse o papel da sinalização pelo GRP em modelos animais para o estudo de defeitos de memória. Neste particular, varias publicações foram geradas por nosso grupo e publicadas em importantes revistas internacionais, como o European Journal of Pharmacology e a Peptides.

Para minha satisfação, os resultados desta tese foram submetidos à revista Nature Medicine e esperamos que a mesma seja aceita. Espero, sinceramente, que os nossos esforços possam contribuir com o desenvolvimento de um novo medicamento ativo, que torne a vida dos nossos pacientes mais agradável.