UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Flávio Lopes Ferreira

EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CLIVAGEM DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

BELO HORIZONTE

2007

Flávio Lopes Ferreira

EFEITOS DA INIBIÇÃO DA CLIVAGEM DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF) EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Dissertação apresentada ao colegiado do curso de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Belo Horizonte

2007

Gostaria de dedicar o trabalho
desses três anos e meio
que aqui se encerram
a quatro pessoas:

Ao Dr. Paulo Roberto Ferreira Henriques,
exemplo eterno;

Ao Dr. Jorge Kishikawa e

À Zaira e Branco.

Com vocês aprendi
a sonhar alto,
a sorrir com meus acertos e rir de meus erros,
a levantar após cada queda e continuar,
a acreditar num futuro melhor,
a aguardar o tempo de cada um,
a respeitar a vida em suas mais diversas formas,
a ter uma enorme firmeza de caráter e
a ter compaixão com os outros, principalmente
comigo, nesse louco redemoinho que chamamos
viver.

Agradecimentos:

Ao concluir essa dissertação, constituída de tantos projetos desenvolvidos durante esse tempo, creio que para ser justo, teria mais páginas de agradecimento do que toda minha dissertação ou ainda toda minha referência bibliográfica, se impressa!

Fatalmente corro o risco de esquecer alguém que contribuiu de alguma forma para meu aprendizado nesse período. Por isso, se ao final desta longa lista, você não se encontrar, por favor, me perdoe e receba meu sincero agradecimento no fundo de seu coração.

À minha querida professora Sasá, vulgo Maria Salete de Abreu Castro, pela acolhida, pelo exemplo, pela didática, pelos "pitos" e pelo café, pela compaixão, enfim, por todas as características suas, Sasá, que da melhor maneira possível eu me apropriei e que me fizeram uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, professor Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade, por todo o auxilio, pela compreensão desse seu aluno "médico" (argh!) e, sobretudo pela paciência.

Aos colegas do laboratório de Imunofarmacologia, passados e presentes:

Profas Danielle Glória (Dani Pessoa!) e Vanessa Pinho, Prof Antônio Teixeira

Adriana (pelas risadas e pelo carinho), Adriano (pela exatidão, protocolos perfeitos e disponibilidade eterna em ajudar, saudades), Aline (pela alegria). Amanda (pelo pré-namoro), Antonio (pelos caracóis de seus cabelos), Carol (pela sofrida divisão do respirador de ratos), Caio (por tanta coisa...), Cremosura (Daniela Sachs) (pelos conselhos científicos e sentimentais), Cris (pela agilidade em tudo), Dani (Ihiii por... tanta coisa...), Daniel (arigatô pela entonação), David Henrique (por emprestar a balança), Davi (pela humildade), Dorinha (pelo cuidado com nossos animais), Ester (pelo sotaque saudoso), Fernanda (dentre tantas coisas, pelo colágeno...), Flávio Amaral (sem palavras), Ildeu (pela elegância), Ilma (pela paciência conosco), Juliana (pela disponibilidade), Kátia (Ichi... por tantas coisas tb...), Landa (Linda! Nem precisa falar, né?), Letícia (pela delicadeza), Lora (Angélica) (por ter resistido), Lucíola (saudades), Márcia (pela agradável convivência), Maria (pela solidariedade), Marina (pela convivência), Michele (pelas "lourices"), Norine (pelo sorriso), Pedro (pela luta), Rafael (pela empatia), Remo (Por tantos papos, papers e "álcoois" pela calça), Rodrigo (pelos sons e viagens), Tiça (pela ajuda desinteressada e pelo bom-humor habitual), Val (pela eficiência constante), Vanessa Pinho (pelos esclarecimentos imunológicos), Vanessa Mendonça (pelos empréstimos do computador), Vinitcho (Vinicius) (pelas risadas e piadinhas) e Vivian (outra... sem palavras...).
Um agradecimento mais do que especial para as **DANI'S (GLÓRIA E SACHS)**, pelo apoio e incentivo, e um MUITISSIMO OBRIGADO ao meu xará **FLÁVIO AMARAL**, à **VIVIAN** e ao **CAIO**.

Aos professores da UFMG da pós-graduação (ou não), mas que contribuíram para meu aprendizado de alguma forma, dentre eles:

Adelina Martha dos Reis, Alvair Pinto de Almeida, Anderson José Ferreira, Andréa Siqueira Haibara, Cândido Celso Coimbra, Cleida Aparecida de Oliveira, Dalton Luiz Ferreira Alves, Evanguedes Kalapothakis, Igor Dimitri Gama Duarte , Ivan Barbosa Machado Sampaio, Janetti Nogueira de Francischi , Maria de Lourdes Rocha de Lima, Maria Salete de Abreu Castro , Míriam Teresa Paz Lopes, Paulo Eustáquio de Brito Santos , Steyner de França Côrtes , Steyner de França Côrtes, Virgínia Soares Lemos

Agradecimento especial aos professores André Talvani (UFOP) e Juliana Tavares por aceitarem participar da banca e possibilitarem meu crescimento e aprimoramento.

À Celinha, pela ajuda.

Ao prof. Marcos Vinicius Melo Andrade e ao Rodolfo Assis Lisboa (FM-UFMG), à Landa e ao Bruno Brasil (UFMG) pelo auxílio com a zimografia.

Aos colegas de outros laboratórios, com os quais tive a oportunidade de conviver especialmente aos colegas do lab Inflamação e dor: Adolfo, Àtila, Natascha, Bareta, Cíntia, Dorothea, Gustavo, Heloisa, Júlia, Patrícia e Rafael; do lab Dor e analgesia: Dani's, Gláucia e Renato (e sua viola); do lab Substâncias anti tumorais: Cristiana, Ricardo, Vanessa e Sandrinha e aos colegas e amigos de vários laboratórios: Ana Luisa, Maira, Higgor, Guilherme Medeiros, Priscila, Marco Túlio, Filipe, Dadá (Adaliene), Vinicius Cota, Quelé, Denise Rover, Luciano, José Felipe e Bruno.

Aos funcionários do CEBIO e da Farmacologia em especial, Adelaide, Adriane Aparecida, Carlos Henrique Pacheco, Dinah Cerqueira Santos, Jorge Costa Ferreira, Marlina Aparecida Ribeiro, Rinaldo do Nascimento e Webster Glayser Pimenta dos Reis.

À toda a minha família: pais (Branco e Zaira), irmãos (Lincoln, Eneida, Blanco e Rodrigo), cunhado (Rogério) e cunhadas (Maria Olímpia, Glenda e Lílian), sobrinhas (Renata, Paula, Bruna, Carolina e Júlia) e sobrinhos (Rodrigo, Bernardo e Vítor) por agüentarem as "barras", compreenderem as ausências e se alegrarem com as conquistas!

Aos colegas e amigos do hospital Life Center, em especial ao Dr Arquimedes Nascentes, pelo seu apoio, confiança e amizade, à Aline, ao Raul, ao Saulo, ao Cláudio Lemos, ao Guilherme (pelo auxilio com a troca de plantões) e ao Yerkes.

Aos colegas e amigos da Uniminas/MEA em especial ao Marco Antônio, Frederico, Leonardo, Carla, Alexandra, Margareth e Amanda.

Aos colegas e amigos da Unifenas em especial à profa Rosa Malena, prof Fuad, ao Iure e ao Antônio Carlos.

Aos colegas e amigos da Reanimação, em especial à Vivian, ao Sérgio e ao Marco Victor.

Aos alunos da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais e aos alunos de Medicina da Unifenas. Agradecimento especial a todos os monitores (atuais e passados) da disciplina!

Ao animal experimental.

Como foi bom! Obrigado pela ajuda, seja ela da forma, da intensidade, da duração, da freqüência e com a intenção que ela tenha sido!

RESUMO:

O TNF-α tem um papel importante na letalidade e nas lesões que acompanham a reperfusão. Nesse trabalho, nós avaliamos o efeito de dois inibidores duais da enzima conversora de TNF-α (TACE) e das metaloproteinases de matriz (MMP), denominados PKF242-484 e PKF241-466. Nós examinamos o papel destas enzimas na modulação dos níveis séricos e teciduais de TNF-α após lesão de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos, observando a letalidade e a extensão da lesão tecidual. Animais que durante a reperfusão foram tratados com PKF242-484 ou PKF241-466 apresentaram uma redução dose-dependente dos níveis séricos de TNF-α. De acordo com esse resultado, esses dois compostos foram capazes de retardar ou prevenir parcialmente a letalidade que acompanha as lesões de isquemia reperfusão. A inibição máxima ocorreu com a dose de 10 mg/Kg. Os inibidores duais da TACE e das MMPs reduziram as lesões associadas à reperfusão localmente e à distância, avaliadas pela alteração da permeabilidade vascular, recrutamento de neutrófilos e grau de hemorragia. Além disso, PKF242-484 ou PKF241-466 reduziram a produção de TNF-α, KC e MCP-1 no intestino e pulmão de animais submetidos à reperfusão. Em contraste, nem PKF242-484 ou PKF241-466, afetaram as concentrações séricas e teciduais de IL-10, uma citocina antiinflamatória. Para testar a relevância da inibição das MMPs

nesses resultados acima, nós utilizamos um inibidor específico de MMPs que não possui efeito inibitório na TACE, o FN-439. O tratamento com 10 mg/Kg de FN-439, inibiu a atividade das MMPs avaliadas por zimografia mas não demonstrou efeito na letalidade nem foi capaz de reduzir a produção de TNF-α solúvel. Não observamos alterações nos demais parâmetros inflamatórios de lesão tecidual. PKF242-484 e PKF241-466, novos inibidores duais da TACE e das MMPs foram efetivos em melhorar as lesões teciduais associadas à reperfusão assim como a resposta inflamatória sistêmica. A utilização desses compostos pode ser um coadjuvante no tratamento das lesões que acompanham a reperfusão de territórios vasculares isquêmicos. Tratamento com inibidores específicos das MMPs não demonstrou benefício nesse modelo. A inibição da capacidade de clivagem de TNF-α pela TACE parece ser o principal mecanismo envolvido na resposta benéfica com o uso de PKF242-484 ou PKF241-466.

Palavras-chave

Inflamação, neutrófilos, TNF-α, TACE, MMP, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, FN-439

Abstract:

TNF-α plays an important role in reperfusion-induced tissue injury and lethality. Here, we assessed the effect of PKF242-484 and PKF241-466, two dual inhibitors of TNF-α converting enzyme (TACE) and matrix metalloproteinases (MMPs). We examine the role of these enzymes modulating TNF-α levels in tissue and serum after ischemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in mice using lethality and the extent of tissue injury. Reperfused animals that received PKF242-484 or PKF241-466 treatment had a dose dependent reduction of TNF-α concentrations in serum. In agreement with this last result, both drugs were able to delay and partially inhibit lethality induced by ischemia and reperfusion. Maximal inhibition occurred at 10 mg/kg. TACE and MMPs inhibitors reduced reperfusion associated local and remote tissue injury, as assessed by changes in vascular permeability, neutrophil recruitment and haemorrhage. In addition, PKF242-484 or PKF241-466 markedly reduced the production of TNF-α, KC and MCP-1 in intestine and lungs of animals which underwent reperfusion. In contrast, nor PKF242-484 or PKF241-466 affected the elevations of serum and tissue levels of anti-inflammatory cytokine IL-10. To test the relevance of MMP in these results we used a specific inhibitor of MMP which possesses no effect on TACE, FN-439. The treatment with 10 mg/kg of FN-439 decreased MMPs's activities assessed by zimography but showed no

effects on lethality nor could reduce production of soluble TNF-α . No changes in other measured inflammatory parameters were observed. PKF242-484 and PKF241-466, a novel dual TACE and MMPs inhibitors, were effective in improving reperfusion-associated tissue injury and systemic inflammation. Combined TACE and MMPs inhibitors may be effective co-adjuvants in treatments of injuries that follow reperfusion of an ischemic vascular territory. Treatment with specific inhibitors of MMP in this model showed no advantages. Inhibition of TACE's ability in shed TNF-α seems to be the main mechanism involved in this beneficial response.

Keywords:

Inflammation, neutrophils, TNF-α, TACE, MMP, systemic inflammatory response syndrome, FN-439

Legendas de ilustrações e tabelas

Página

Figura 1: Efeito do tratamento com PKF241-466 (A) ou PKF242-484 (B) nas concentrações séricas de TNF-α solúvel em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min) 61

Figura 2: Efeitos dos tratamentos com PKF241-466 (A) ou PKF242-484 (B) na letalidade em modelo de lesão intestinal de isquemia e reperfusão. 62

Figura 3: Efeito do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 na permeabilidade vascular (A, B), migração de neutrófilos (C, D) em intestino e pulmão, respectivamente em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min).....64

Figura 4: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 no conteúdo intestinal de hemoglobina em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min).....65

Figura 5: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de TNF-α (A,B), no intestino e no pulmão em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min).....67

Figura 6: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de MCP-1 (A,B) e KC (E, F) no intestino e no pulmão em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min) 68

Figura 7: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de IL-10 no intestino e no pulmão em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min).....69

Figura 8: Efeitos dos tratamentos com FN-439 na letalidade em modelo de lesão intestinal de isquemia e reperfusão.....70

Página

Figura 9: Zimografia em gel de caseína da MMP-3 e da pró-MMP-3 após SDS-PAGE em gel de 10.5% de poliacrilamida em condições não-redutoras.....74

Figura 10: Zimografia em gel de gelatina da MMP-2 e da pró-MMP-2 após SDS-PAGE em gel de 10.5% de poliacrilamida em condições não-redutoras.....75

Tabela 1: Níveis séricos de TNF-α e parâmetros inflamatórios medidos no intestino de camundongos submetidos à isquemia (60 min) e reperfusão (30 min) da artéria mesentérica, tratados com o inibidor de metaloproteinase de matriz FN-439 (10 mg/Kg EV) 10 minutos antes do inicio da reperfusão.....72

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

ADAMs - Proteases que contém domínios de desintegrinas e metaloproteinase ("***A*** ***d****esintegrin* ***a****nd* ***m****etalloproteinase"*)

AMS – artéria mesentérica superior

Bcl-2 – "*B-cell Lymphoma 2"*

BSA - Soroalbumina bovina

CAS – ("*Chemical Abstracts Service")*

CCL2 (MCP-1) - Proteína quimiotática para monócito -1

cm – Centímetros

CXC - Quimiocinas relacionadas à interleucina 8 (IL-8)

CXCL1-3 (KC) - Quimiocina derivada de queratinócito

CXCR – Receptor de quimiocinas relacionadas à interleucina 8 (IL-8)

dH_2O – Água destilada

ECM – Matriz extracelular *("Extracellular matrix"*)

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético ("EthyleneDiamineTetrAcetic acid")

ELISA – ("*Enzyme-linked immunosorbent assay*")

ERK – (*"Extracellular signal-related kinase")*

FIG - Figura

g – Gramas

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4. Ácido sulfúrico

HTAB - Brometo de(*"hexadecyltrimethylammonium*")

i.p. –Intraperitoneal

i.v. - Intravenoso

I/R – Isquemia/ reperfusão

I60R30 – 60 minutos de isquemia seguidos por 30 minutos de reperfusão

ICAM ( ) – Molécula de adesão celular ("*Cell Adhesion Molecule*") ( )

ICE - Enzima conversora de IL-1β (ICE ou caspase -1).

IFN-γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulinas

IL - ( ) - Interleucina ( )

IL-10 - Interleucina -10

IL-1RII - Receptor 2 para IL-1

IL-6 - Interleucina –6

IL-6Rα - Receptor alfa para IL-6

IL-8 - Interleucina –8

IP – Intra-peritoneal

i.v. – Intra-venoso

JNK – (*"Jun N-terminal kinase")*

kDA - Kilodalton

Kg- Kilogramas

LPS - Lipopolissacárides

MadCAM – Adressina vascular de mucosa

MCP-( ) – Proteína quimiotática para monócito – ( )

MCP-1 – Proteína quimiotática para monócito -1

mg – Miligramas

Milli-Q H_2O – Água ultra pura

min - Minutos

MIP-2 - Proteína da inflamação do macrófago 2

mL –Mililitros

mM – Milimolar

MMP- ( ) – Metaloproteinase de matriz tipo ( )

MMPs - Metaloproteinases de matriz *("Matrix Metalloproteinases"*)

MPO – Mieloperoxidase

MT1 – (*"Membrane-type 1")*

MT-MMPs - Metaloproteinases de matriz ligadas à membrana *("Membrane Type Matrix Metalloproteinases"*)

μg- microgramas

μg- microgramas

μm- micrometros

μm- micrometros

n – número de experimentos

NaCl – Cloreto de sódio

NaEDTA – EDTA de sódio

$NaPO_4$ - Fosfato de sódio

N.D. – Não detectável

NF-κB – Fator nuclear κB (*"nuclear factor-kB")*

NK - Linfócitos matadores naturais (ou "natural killer")

nM - NanoMolar

nm- Nanômetro

NO - Óxido nítrico

NO-sintase – Óxido nítrico sintase

O. D. – Densidade óptica.

O^{-}_{2} - Íons superóxidos

^{o}C – Graus Celsius

p38 – (*"p38 kinase")*

PAF – Fator de ativação plaquetária

PAI - Ativador de plasminogênio (*"Plasminogen activator")*

PAI-1 –(*"PA inhibitor")*

PBS - Tampão fosfato de sódio ("*Phosphate-buffered saline*").

PE 10 – Polipropileno 10

PECAM – Molécula de adesão celular endotélio-plaqueta

pg - picogramas

PI3K – (*"Phosphoinositide 3-kinase")*

PKA – Proteína quinase A

PM – Peso molecular.

PMNs – Polimorfonucleares

pro-MMP – pró-enzima de metaloproteinase de matriz

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Rpm – Rotações por minuto

s.c. – Subcutâneo

SDS - Dodecil sulfato de sódio ("*Sodium dodecyl sulfate"*)

SEM – Erro padrão da média

SOD – Superóxido dismutase

TAB - tabela

TGF-α – Fator de crescimento transformador alfa ("*Transforming growth factor α*")

Th1- Linfócitos T helper tipo 1

Th2- Linfócitos T helper tipo 2

TIMP – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz ("*Tissue inhibitor of MMPs"*)

TNFR ( ) – Receptor do fator de necrose tumoral tipo ( )

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TNF-β - Fator de necrose tumoral beta

tPA - Ativador de plasminogênio tipo tecidual *(*"*Tissue type plasminogen activator*")

Tris – [*"(Hydroxymethyl)aminomethane"]*

uPA – Ativador de plasminogênio tipo uroquinase (“*Urokinase-type plasminogen activator”*)

uPAR- receptor uPA

VCAM ( ) - moléculas de adesão em células vasculares ( )

Veic - Veículo

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....19

1.1. A importância das lesões de isquemia e reperfusão.....20

1.2. A importância dos leucócitos nas lesões de isquemia e reperfusão.....24

1.3. O neutrófilo.....27

1.4. As citocinas.....28

1.5. As quimiocinas.....32

1.6. As metaloproteinases de matriz (MMPs).....35

2. OBJETIVOS.....38

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....40

4. MATERIAL E MÉTODOS.....42

4.1. Animais.....43

4.2. Isquemia e reperfusão intestinal.....43

4.3. Avaliação da permeabilidade vascular.....44

4.4. Determinação dos níveis de citocinas.....45

4.5. Dosagem de mieloperoxidase (MPO).....47

4.6. Quantificação de hemoglobina.....49

4.7. Zimografia.....50

4.8. Drogas, reagentes e aparelhos.....52

4.9. Análise estatística.....57

Página

4.10. Pesquisa bibliográfica.....57

5. RESULTADOS.....59

5.1. Efeitos dos tratamentos com *PKF242-484 ou PKF241-466* na letalidade e na elevação dos níveis séricos de TNF-α.....60

5.2. Efeitos dos tratamentos com *PKF242-484 ou PKF241-466* nas lesões teciduais locais e à distância.....63

5.3. Efeitos do tratamento com *PKF242-484 ou PKF241-466* nas concentrações teciduais de citocinas e quimiocinas.....66

5.4. Efeitos do tratamento com *FN-439* na letalidade de animais submetidos à isquemia e reperfusão.....70

5.5. Efeitos do tratamento com *FN-439, PKF242-484 ou PKF241-466* na atividade das MMPs.....73

6. DISCUSSÃO.....76

7. CONCLUSÃO.....90

8. REFERÊNCIAS.....92

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A importância das lesões de isquemia e reperfusão.

Situações onde o fluxo de oxigênio para as células é agudamente reduzido levando à ocorrência de hipóxia/anóxia podem comprometer desde a viabilidade celular até a função orgânica e a integridade do organismo. Várias doenças cursam com um fluxo sanguíneo comprometido para um leito vascular regional, para todo um órgão ou globalmente para o organismo. Podem ser citadas a parada cardíaca, as lesões traumáticas (choque hipovolêmico ou distributivo) e as isquemias regionais como a isquemia intestinal ou o infarto agudo do miocárdio (WEIL et al., 2001). Elas constituem uma das maiores causas de morbi-mortalidade em nossa sociedade. A possibilidade de reversão dessas lesões está correlacionada com o tempo e a intensidade da privação de oxigênio, assim como à capacidade da célula ou tecido em tolerar a privação de oxigênio.

Dentre os vários agentes responsáveis pelas lesões que ocorrem durante a isquemia, podemos destacar as alterações mitocondriais, a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a liberação de depósitos de íon ferro e lesão da microvascularização (CARDEN & GRANGER, 2000).

Avanços substanciais foram feitos, tanto em ações preventivas quanto em ações curativas. Sabemos que inúmeras terapêuticas apresentam um

impacto significativo (ARMSTRONG et al.,2001 a, b) na morbi-mortalidade destas doenças.

Terapêuticas farmacológicas como o uso do ácido acetil-salicílico, dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina, dos β-bloqueadores (ISIS-1) e dos trombolíticos (GISSI-1), assim como uma série de outras intervenções como a angioplastia (GISSI-2), associada ou não ao uso de "*stents*" que são estruturas tubulares metálicas expansíveis colocadas nas artérias e veias obstruídas, impregnados ou não com substâncias anti-ploriferativas (SCHOFER et al. 2003; GRUBE et al 2003) e cirurgias de revascularização, alteraram substancialmente o prognóstico desse grupo de doenças que cursam com isquemia e reperfusão.

Especialmente com a utilização de terapias trombolíticas, houve um grande impacto na sobrevida dos indivíduos acometidos por eventos isquêmicos. Observou-se que, quanto menor o tempo de isquemia, menor eram os danos e seqüelas nesses pacientes. O reconhecimento da importância fundamental do tempo de inicio da terapia fibrinolítica (reperfusão) e seu impacto na sobrevida gerou a metáfora da "hora de ouro" (BOERSMA et al*.,* 1996), tempo no qual 65 vidas eram salvas por 1000 pacientes tratados, em contraste com apenas 10 vidas salvas por 1000 pacientes tratados entre 6 e 12 horas após o inicio dos sintomas (FU et al., 2001) nos processos de isquemia do miocárdio.

Porém a reperfusão, espontânea ou terapêutica, também cursava com lesões (AMBROSIO & TRITTO, 1999; COLLARD, 2001). Os processos envolvidos nessas lesões, denominadas lesões de isquemia e reperfusão (I/R) passaram a ser estudados em diversos modelos de órgãos, gerando considerável quantidade de informação, o que tornou possível a caracterização de importantes mecanismos envolvidos nessas respostas.

Outro dado interessante demonstrado por Galiuto (2003) assim como por Lepper (2000) em suas séries de pacientes com isquemia cardíaca tratados clinicamente demonstra que mesmo após o uso otimizado da terapêutica preconizada atualmente, 66% dos pacientes não apresentavam sinais de reperfusão quando avaliados através de ecocardiografia com contraste. Alguns desenvolveram um quadro de reperfusão lenta, pois a incidência de ausência de reperfusão reduziu-se para 29 a 48% (GALIUTO et al., 2003; LEPPER et al., 2000, respectivamente) após 1 mês da instituição da terapia inicial, culminando em déficits crônicos da função orgânica.

O intestino, particularmente, parece ser um órgão bastante suscetível às lesões de I/R (GRANGER et al., 1986). A isquemia intestinal decorre de inúmeros processos. Podemos citar a obstrução do território venoso ou arterial por aterosclerose, processos trombóticos ou embólicos; intussuscepção ou estrangulamento de hérnias; enterocolites necrotizantes neonatais; pós-transplantes (MASSBERG & MESSMER, 1998; BERLANGA et al., 2002; COLLARD & GELMAN, 2001; STALLION et al., 2005); além de

estados de baixo fluxo intestinal como nos choques hipovolêmico, distributivo e cardiogênico (MOORE et al., 1994; SWANK & DEITCH, 1996), assim como no caso de grandes cirurgias com circulação extracorpórea. A correção de aneurismas de aorta abdominal carrega consigo uma morbi-mortalidade considerável devido à ocorrência de lesões de isquemia e reperfusão intestinal. Em uma revisão, Klompje (1987) relata que a incidência dessa complicação varia de 0,2 a 10% nos casos de cirurgia eletiva, podendo acometer 60% dos pacientes nos casos de cirurgias de urgência, cursando com uma mortalidade de cerca de 40% (variando de 20 a 100%).

Vários estudos propuseram a importância do processo inflamatório, como um dos maiores contribuintes no processo de reperfusão pós-isquemia (VERMA et al., 2002; BEEKHUIZEN et al., 1998; AMBROSIO et al., 1991; LEFER & LEFER 1996; GRANGER 1999; CARDEN & GRANGER, 2000; SOUZA & TEIXEIRA, 2005b). Existem várias evidências que as lesões de reperfusão são fenômenos complexos relacionados à disfunção endotelial e microvascular, ao recrutamento e ativação de leucócitos, a um aumento na produção de mediadores inflamatórios bem como a outros mecanismos como a participação de espécies reativas de oxigênio e a ativação do complemento (BOLLI et al., 1989, KLONER et al., 1987 e ZWEIER et al., 1987).

Em relação ao intestino, além do dano tecidual, existe o risco de acometimento sistêmico devido à possibilidade de translocação bacteriana (MACFIE, 2006) ou da amplificação do processo para órgãos distantes

(SWANK & DEITCH, 1996). Nesse contexto, os estudos de intervenções que por um lado, reduzam as lesões de isquemia e reperfusão e por outro permitam uma reperfusão satisfatória impedindo o surgimento de insuficiências orgânicas são importantes, pois permitem uma abordagem preventiva e/ou curativa em doenças clinicamente relevantes, com elevada morbi-mortalidade, que acometem nossa sociedade.

1.2 A importância dos leucócitos nas lesões de isquemia e reperfusão.

Os leucócitos que entram pela primeira vez no sangue provenientes da medula óssea (células da imunidade inata e células B) ou do timo (células T não estimuladas ou "*naive"*) expressam em sua membrana, padrões de moléculas de adesão que permitem ou restringem sua migração para certas regiões (LUSTER et al., 2005).

Todos os linfócitos são capazes de responder à sinais de ativação alterando a composição, expressão ou atividade funcional de moléculas de adesão. Entretanto as células B e T ativadas necessitam de padrões específicos e dependem da qualidade, da potência e do contexto da estimulação antigênica.

Os linfócitos participam da imunidade adquirida e da memória imunológica e incluem várias populações de células T e B com diferentes padrões de recrutamento. Células "*naive*" migram preferencialmente para

tecidos linfóides, porém células efetoras e células de memória são capazes de adaptar, migrando para áreas onde suas funções são necessárias. Células T que já tiveram contato com antígeno migram de maneira mais eficaz, pois são capazes de aumentar a expressão de moléculas de adesão e de receptores quimiotáticos (XIE et al., 1999). Existem populações adicionais de linfócitos como as células assassinas naturais ("*natural killer"* - NK) e células T reguladoras que também participam dos processos inflamatórios e expressam moléculas de adesão como outros leucócitos. Encontramos na literatura evidências da participação de linfócitos nas lesões de isquemia/reperfusão intestinal, seja via recrutamento mediado por linfócitos T ou através da produção de IgM e ativação da via clássica do complemento por linfócitos tipo B (SHIGEMATSU, 2002.; ZHANG, et al., 2004).

Os mastócitos geralmente são encontrados nos tecidos (mucosas, submucosas, tecido conjuntivo, etc) e nas proximidades de vênulas e arteríolas, onde funcionam como sentinelas. Sinais inflamatórios induzem sua desgranulação com liberação de citocinas, quimiocinas e "secretagogos", que alteram a permeabilidade celular e induzem o recrutamento leucocitário (BENOIST & MATHIS, 2002).

Os granulócitos, grupo que inclui os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos, fazem parte das células de reposta imune inata. Eles expressam uma série de moléculas de adesão e acumulam-se rapidamente em áreas de inflamação através da interação entre essas moléculas e seus receptores em

células endoteliais ativadas (NIGLI, 2003). Os neutrófilos, também denominados leucócitos polimorfonucleados (PMN) são capazes de migrar seguindo gradientes de concentração de substâncias químicas provenientes de tecidos lesados, produtos bacterianos ou através de moléculas induzidas por agentes infecciosos (FOXMAN et al., 1997). Neutrófilos são essenciais para o combate de infecções fúngicas e bacterianas e sua depleção durante o tratamento com quimioterápicos está associada com infecções de alta letalidade por esses patógenos, conforme demonstrado por Winn (1995). Entretanto, sua ativação também pode liberar agentes citotóxicos, causando dano tecidual como podemos observar nas doenças auto-imunes e nas doenças inflamatórias. Vários mecanismos estão envolvidos nessas lesões como, por exemplo, a liberação de radicais livres após o desafio do sistema NADPH oxidase; a liberação de enzimas proteolíticas; a estimulação da liberação de citocinas pelas células locais, promovendo maior recrutamento, além da agregação de leucócitos na circulação gerando alterações da reologia dos capilares, o que acentua o fenômeno de não reperfusão (AMBROSIO & TRITTO, 1999; VERMEIREN, 2000).

Os monócitos, distintamente dos granulócitos, têm maior durabilidade e podem diferenciar tanto em macrófagos residentes em distintos tecidos quanto em células dendríticas. As células da linhagem monocítica estão relacionadas com várias doenças inflamatórias como a aterosclerose, porém elas também são capazes de combater ou controlar infecções crônicas e

participam dos processos de cicatrização. Elas expressam uma série de moléculas de adesão e receptores para quimiocinas. Já as células dendríticas estão associadas a tecidos linfóides e alguns tecidos não-linfóides, onde participam dos processos de apresentação de antígeno e da ativação das células T.

1.3 O neutrófilo

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a capacidade de PMN estimulados em causar danos (HARLAN et al.,1981; SHASBY et al., 1983; DIENER et al., 1985 ; CHEN et al., 2004). O papel dos neutrófilos em lesões de isquemia e reperfusão foi primeiro sugerido pelo estudo de Romson et al. (1983), que mostrou que a administração de anticorpos policlonais contra neutrófilos reduzia o tamanho do infarto do miocárdio em cães. Várias evidências demonstram o papel relevante que os neutrófilos têm na gênese das lesões de I/R (WEIGHT et al., 1996; XIAO et al., 1997; SOUZA et al., 2000a, b; BAXTER, 2002; KOHTANI et al., 2002; MERCHANT et al., 2003).

A liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos azurófilos catalisa a formação de um poderoso ácido oxidante, o ácido hipocloroso, o que pode levar a danos no DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, pode agir no endotélio vascular promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, estimando expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento da

permeabilidade vascular e aumento da adesão de neutrófilos(FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Após desgranulação, o neutrófilo também libera várias substâncias como proteínas antimicrobianas, proteases, componentes da resposta oxidativa, vários receptores de membrana para moléculas de adesão endotelial, metaloproteinases de matriz *("Matrix Metalloproteinases"* - MMPs) e mediadores solúveis da inflamação (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

O processo de recrutamento pode ser dividido em algumas fases como a captura ("*thetering"*) e rolamento ("*rolling*"), a ativação, a adesão, a diapedese ou transmigração e a migração para os sítios de inflamação. Cada uma destas fases ocorre devido a concatenações específicas entre moléculas e seus receptores expressos no neutrófilo, na célula endotelial ou na matriz extracelular ("*Extra-Cellular Matrix"* - ECM), como as selectinas, as integrinas, as quimiocinas e as matrizinas ou MMPs (BURG & PILLINGER, 2001).

1.4 As citocinas

As citocinas são proteínas reguladoras produzidas e secretadas por leucócitos e vários outros tipos celulares. Elas possuem inúmeras ações dentre as quais a regulação das respostas imunológicas inatas e adaptativas, a modulação das respostas inflamatórias além de várias outras atividades

(VILČEK & FELDMANN, 2004). Uma vez liberadas, as citocinas parecem ter um papel importante no orquestramento da resposta celular inflamatória (FRANGOGIANNIS et al., 1998).

O fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina pleiotrópica, foi originalmente descrito nos anos 70 como um mediador da necrose induzido por lipopolissacaride (LPS) em tumores transplantados para o subcutâneo de camundongos (CARSWELL, 1975). Ele apresenta duas formas homólogas: o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), primariamente derivado de fagócitos mononucleares e o fator de necrose tumoral beta (TNF-β), produzido por linfócitos. Entretanto, várias outras células são capazes de produzir o TNF-α, dentre eles os neutrófilos. O TNF-α é sintetizado como uma proteína transmembrânica não-glicosilada de aproximadamente 26 kDA. O TNF de membrana se assemelha a um homotrímero. Um fragmento de 17 kDA de cada subunidade pode ser clivado proteolíticamente gerando sua forma solúvel ativa ou "secretada" (ABBAS & LITCHMAN, 2003). O processo de liberação do TNF como um homotrímero solúvel é realizado pela enzima de conversão do TNF-α (TACE) descrita independentemente por Black. et al. (1997) e Moss et al. (1997).

A TACE pertence à família das "*metzincina"* de metaloproteinase de zinco que inclui as MMP e proteases que contém domínios de desintegrinas e metaloproteinase (ADAMs). Ela também é denominada ADAM17, CD156b ou EC3.2.24.86 (MEZYK et al., 2003). Essas enzimas são responsáveis pela

clivagem de uma série de proteínas transmembrana, e especificamente, a TACE, além de ser a principal responsável pela liberação do TNF solúvel, age sobre vários outros substratos (SOOND et al., 2005) envolvidos na resposta inflamatória e na imunoregulação.

Uma vez em sua forma solúvel, o TNF-α se liga a duas classes distintas de receptores celulares denominados TNFR I (p55) e TNFR II (p75) (TARTAGLIA & GOEDDEL, 1992). Os avanços da biologia molecular demonstraram que existem uma série de outras moléculas capazes de se ligarem ao TNF ou mimetizarem seus efeitos e por isso foram chamados conjuntamente de "superfamília" de TNF/TNFR. O TNF-α pode interagir com células endoteliais e induzi-las à expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e selectina E, permitindo o acesso de granulócitos aos focos de inflamação. Essa citocina é um potente ativador de neutrófilos mediando a aderência, a quimiotaxia, a desgranulação e a explosão oxidativa ("*oxidative burst*"). Ela também é capaz de causar alterações de permeabilidade vascular (HEHLGANS & PFEFFER, 2005).

Os aspectos moleculares das interações entre o TNF e seus receptores são bastante complexos e por vezes redundantes, ocorrendo ativação de diversos mecanismos intracelulares como cascatas de caspases (CHINNAIYAN et al., 1996; KISCHKEL et al., 2000), fator nuclear kB (NFkB), quinases Jun N-terminais (JNK) (STANGER et al.1995; HSU et al., 1996), quinases p38, quinases relacionadas a sinal extracelular (ERK) e quinases de

fosfoinositol 3 (PI3K) (DEMPSEY, et al., 2003). A análise detalhada das vias envolvidas nas ações no TNF foge ao escopo desta dissertação.

Estudos prévios demonstraram a importância do TNF-α nas lesões e na letalidade após I/R (WELBORN et al., 1996; CARDEN & GRANGER 2000; GRANGER et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2001). Corroborando com estes estudos, trabalhos realizados no laboratório de Imunofarmacologia da UFMG têm demonstrado que as concentrações séricas de TNF-α parecem ser as que melhor se correlacionam com a letalidade no modelo de I/R intestinal (SOUZA et al., 2001, 2002).

Outra citocina de destaque nesse cenário é a interleucina 10 (IL-10). Ela também pode ser produzida por vários tipos celulares e participa da resposta antiinflamatória, reduzindo a produção de agentes pro-inflamatórios. A IL-10 pode reduzir a produção de TNF-α por monócitos e células NK, além de várias citocinas e fatores de adesão. Dentre as ações antiinflamatórias da IL-10 também está a expressão de antagonistas de mediadores pro-inflamatórios como os receptores solúveis de TNF (MOORE et al., 2001; SOUZA et al., 2003a; SOUZA & TEXEIRA, 2005b).

Várias citocinas podem estimular a secreção de IL-10, como o próprio TNF-α sugerindo um mecanismo homeostático onde um estímulo inflamatório induz a secreção de TNF-α que, por sua vez, induz a secreção de IL-10 que reduz a síntese do próprio TNF-α (BORISH & STEINKE, 2003).

Podemos encontrar na literatura estudos que demonstram a participação da IL-10 nas lesões de I/R (ZINGARELLI et al., 2001). A administração de IL-10 exógena é capaz de reduzir a resposta inflamatória, a produção de citocinas e o acúmulo de neutrófilos em modelos de I/R intestinal (LANE et al., 1997; SOUZA et al., 2003a, 2004c).

Avaliar o balanço entre TNF-α e a IL-10 é importante frente às novas terapêuticas propostas para essas lesões.

1.5 As quimiocinas

As quimiocinas são pequenas moléculas (peso molecular variando de 8 a 12 kDA) que participam da quimiotaxia de leucócitos e também modulam a angiogênese, a cicatrização e a migração tumoral. Elas são produzidas por uma variedade de células incluindo: neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos e queratinócitos (BORISH & STEINK, 2003), células endoteliais (BRIONES et al., 2001), células epiteliais (SEXTON & WALSH, 2002), células dendríticas (VULCANO, 2001) e células T (MATSUMOTO et al., 1998).

Essas proteínas são caracterizadas pela presença de quatro resíduos de cisteína conservados na porção amino-terminal. Dependendo da presença ou não de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, podem ser classificadas como CC (CCL de 1-28), CXC (CXCL de 1-16), CX_3C (CX_3CL1/

fractalkine) e, ainda, existe a quimiocina C que possui somente uma cisteína na porção N-terminal (XCL1 e XCL2/ "*lymphotactin-alpha"* e "*lymphotactin-beta*", respectivamente) (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). As quimiocinas contribuem para resposta inflamatória dada sua capacidade de induzir recrutamento e ativar populações de leucócitos, induzir desgranulação e levar à liberação de mediadores inflamatórios de células efetoras tais como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Entretanto, essas moléculas também exercem um papel essencial para a homeostase do sistema imune.

Algumas quimiocinas apresentam função de dirigir o recrutamento de células para os tecidos linfóides (SALLUSTO & MACKAY, 2004). Contudo, o estudo das quimiocinas nos últimos anos tem contribuído para o entendimento do seu papel nas diversas doenças inflamatórias, na hematopoiese, na angiogênese, metástases, rejeição de tumores, diferenciação de células T e na infecção por HIV (JOHNSON, 2004; LUTHER & CYSTER, 2001; BELPERIO, 2000; YOUN, 2000).

Johnson et al. (2004) apresentou uma interessante revisão sobre a modulação das propriedades das quimiocinas. Particularmente a modulação da quimiotaxia, processo complexo que necessita da apresentação da quimiocina associada ao glicosaminoglicano (GAG) (PROUDFOOT, 2006), ocupação e ativação de receptores, e transdução intracelular de sinais (JOHNSON et al., 2004), tem sido investigada no contexto de várias doenças como na I/R (SOUZA et al.,2004a), asma (WALSH, 2006), artrite reumatóide

(DAWSON et al., 2003), esclerose múltipla (TSUNODA et al., 2004) e doenças inflamatórias intestinais (MACDERMOTT, 1999).

A quimiocina mais importante para o recrutamento de PMN e mais potente para o neutrófilo é a CXCL8 (IL-8) em humanos (BAGGIOLINI et al., 1994; BAGGIOLINI et al., 1997; BORISH et al., 2003). Ela pode ser produzida por vários tipos celulares dentre eles os fagócitos mononucleares, células epiteliais e endoteliais, linfócitos T, eosinófilos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos e hepatócitos.

Em camundongos, as quimiocinas denominadas proteína da inflamação do macrófago 2 (MIP-2) e quimiocina derivada de queratinócito (CXCL1-3 KC) são homólogas de CXCL-8 e se ligam a seu receptor CXCR2 (BOZIC et al., 1994; LEE et al., 1995). Segundo Calcalano (1994), neutrófilos de camundongos deficientes para a expressão do CXCR2 foram incapazes de migrar para o peritônio em modelo de peritonite química. Além disso, esses animais são geralmente pequenos, exibem cicatrização retardada, apresentam pouca resistência a infecções e não respondem bem ao estresse do ambiente (DEVALARAJA et al., 2000).

A família de quimiocinas CC é a mais diversa e numerosa segundo Locati et al. (2002). Ela pode ser subdividida em quimiocinas constitutivas e induzidas. Acredita-se que as quimiocinas CC constitutivas participam dos processos habituais de migração leucocitária enquanto que as quimiocinas CC induzidas regulam o recrutamento leucocitário em reposta a sinais

imunológicos, inflamatórios e infecciosos. Dentre elas podemos salientar a proteína quimiotática para monócito – 1 (CCL2/MCP1). Sua ligação com seu receptor CCR2, contribui significativamente para os processos inflamatórios incluindo a aterosclerose. Camundongos deficientes para esse receptor desenvolvem-se normalmente, mas são incapazes de recrutar macrófagos em modelos de inflamação induzida por peritonite quimica, não são capazes de eliminar eficazmente patógenos fagocitados como *Listeria monocytogenes* e tem menores granulomas após desafio com β-glican fúngico, (KURIHARA et al., 1997; KUZIEL at al., 1997).

Quimiocinas da familia CC são ainda capazes de induzir a produção de proteases como MMPs e ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) em células tumorais e em macrófagos (OPDENAKKER et al.,1992). Essas enzimas são importantes nos processos de migração celular.

1.6 As metaloproteinases de matriz (MMPs)

A matriz extracelular (*extra-cellular matrix* - ECM) é composta de uma mistura complexa de moléculas insolúveis que incluem colágenos, lamininas, fibronectinas, "*entactinas/nidogens*" e proteoglicanos de sulfato de heparan (MOTT & WERB, 2004). A ECM não é somente uma base sólida para o suporte celular, mas na verdade ela também é um reservatório de citocinas e fatores de crescimento. Através de receptores de ECM, as células são

capazes de avaliar as condições locais e reagir a estímulos (MIRANTI & BRUGGE, 2002; MICHELE & CAMPBELL; 2003; YONEDA & COUCHMAN, 2003, HYNES, 2002). Neste contexto a proteólise da ECM é de extrema importância, pois pode alterar a aderência celular além de liberar vários fragmentos bioativos, dentre eles GAGs, fatores de crescimento e citocinas (McCAWLEY & MATRISIAN, 2001; SCHENK & QUARANTA, 2003; ORTEGA & WERB, 2002).

Todos os componentes da ECM podem ser degradados pelas MMPs. Essas enzimas pertencem à superfamília das metzincinas que inclui as proteases astacinas, ADAMs, e ADAM com motivo semelhante à trombospondina (ADAM-TS) (STERNLICHT & WERB, 2001). Devido às semelhanças nos domínios de metaloproteinase, existe potencial de sobreposição funcional entre as famílias. Existem ainda formas solúveis e formas ligadas à membrana celular (MT-MMP) (SEIKI, 2002). As MMPs possuem inibidores endógenos denominados inibidores teciduais de metaloproteinases *("Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinase"* – TIMPs). Atualmente existem quatro formas de TIMP (TIMP 1-4) com diferentes eficácias para diferentes enzimas (PRESTON, 2002).

De forma similar a outras proteinases, a atividade catalítica das MMPs pode ser regulada de quatro maneiras distintas: na expressão gênica, na compartimentalização (isto é, o acúmulo pericelular destas enzimas), pela ativação de pro-enzimas secretadas (Pro-MMPs) e pela ação dos TIMPs

(PARKER et al., 2004). Sua atividade catalítica também é controlada pela disponibilidade e afinidade a substratos específicos.

Segundo Preston (2002), vários processos patológicos estão associados à ação da MMP como crescimento tumoral e formação de metástases, fibroses, artrite, glaucoma, lupus, esclerose múltipla, escleroderma, cirrose, aneurismas aórticos, infertilidade e inúmeras outras doenças. Porém, pouco ainda se sabe sobre o papel destas enzimas nas lesões de I/R. Estudos recentes com o uso de inibidores destas enzimas tem demonstrado um possível efeito protetor em modelos hepáticos, cardíacos e cerebrais de I/R (KHANDOGA et al., 2006; VIAPPIANI et al., 2006; JANSSENS & LIJNEN, 2006; YANG et al, 2006). Entretanto, ainda não existem estudos avaliando o uso destas drogas nas lesões de I/R intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos

Considerando o impacto das lesões de I/R na morbi-mortalidade em nossa sociedade, o papel dos leucócitos, particularmente o neutrófilo, na resposta inflamatória que acompanha essas lesões, a observação que citocinas e quimiocinas participam no processo de recrutamento celular, que dentre elas o TNF-α parece ter um papel pró-inflamatório relevante nesse modelo, que seus níveis séricos podem se correlacionar com a gravidade das lesões e sendo a TACE a principal enzima responsável pela clivagem do TNF-α, nós perguntamos:

As lesões que acompanham a I/R intestinal no modelo em camundongos dependem da ação da TACE sobre o TNF-α ?

Agentes inibidores da TACE são capazes de alterar a letalidade e os parâmetros inflamatórios nessas lesões?

Existe participação de outras citocinas/quimiocinas, particularmente a IL-10 nesse processo?

A ação destes fármacos nesse modelo se deve também à inibição das MMP?

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para responder às questões acima, utilizamos um modelo de isquemia e reperfusão intestinal em camundongos. Esse modelo apresenta as características necessárias para o acompanhamento de fatores relevantes do processo inflamatório agudo (SOUZA, 2004c). A escolha do camundongo como animal experimental é custo-benefício satisfatório além de permitir um gasto reduzido de fármacos.

Para obter as inibições desejadas em nosso experimento, os compostos *PKF242-484* e *PKF241-4*66, inibidores duais da TACE e das MMPs (TRIFILIEFF et al., 2002), foram utilizados. Eles são capazes de inibição da TACE, das MMPs: 1, 2, 3, 9, 13, e da colagenase murina em concentrações nanomolares. O composto *FN-439* inibe unicamente MMPs. Ele é capaz de inibir várias MMPs à saber, MMP 1, 3, 8 e 9 (HAGEMANN et al, 2004; ODAKE et al., 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Camundongos C57/BL6 machos, entre 8-10 semanas de idade (peso médio 25g), foram obtidos do CEBIO/UFMG e mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso à ração e água. O protocolo descrito à seguir foi submetido à aprovação do comitê local de ética em pesquisa animal.

4.2 Isquemia e reperfusão intestinal

Os animais foram anestesiados com uretana (1400 mg/kg, i.p.) Após confirmação de plano anestésico adequado foi realizado uma laparotomia mediana. A artéria mesentérica superior era então identificada, isolada e totalmente ocluída através de ligadura com fio de algodão, utilizando-se como anteparo aproximadamente 0,5 cm de cânula de polietileno (PE 10) (Isquemia). Observava-se macroscopicamente a redução da coloração das alças intestinais. Os animais foram mantidos em berço aquecedor-EFF 421 (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), para controle da temperatura corporal em 36,8 ±2 ºC conforme CHEN et al. (2006). Após 60 minutos (min) a reperfusão era obtida através da retirada da ligadura.

Os animais foram monitorizados em intervalos de tempos indicados para a obtenção das curvas de letalidade.

Para a medida dos parâmetros inflamatórios, observou-se o tempo de 30 min de reperfusão (I60R30). Este tempo de reperfusão (30 min) foi escolhido baseado nas observações de Souza et al. (2003c) onde foi observado lesão tecidual significativa sem elevadas taxas de mortalidade, assim como em observações pessoais. Após o término do período de reperfusão os animais eram sacrificados e as amostras de tecido coletadas. Animais sham-operados foram utilizados como controle.

As drogas em estudo (descritas abaixo) foram administradas intravenosamente (i.v.) 10 min antes da reperfusão.

Animais do grupo controle submetidos à isquemia e reperfusão receberam o mesmo veículo utilizado na diluição das drogas.

4.3 Avaliação da permeabilidade vascular

O extravasamento de azul de Evans para o tecido foi usado como índice de aumento de permeabilidade vascular (MATOS et al., 1999 e SOUZA et al., 2000a). Azul de Evans (2%) foi administrado i.v. (1 mL/kg) via veia da cauda 5 min antes da reperfusão do leito isquêmico.

Após o sacrifício do animal um fragmento de 3 cm de intestino foi cortado e colocado em placa de Petri para secagem por 24 horas em estufa a

40°C. O peso seco do tecido era então mensurado e o tecido era incubado com 1 mL de formamida por 24 horas (temperatura ambiente) para extração do corante.

O corante extraído do tecido foi quantificado em leitor *"enzyme-linked immunosorbent assay"* (ELISA) (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 620 nm e a concentração determinada através de curva padrão de 0.375 a 10 μg/mL de azul de Evans.

O ventrículo direito foi infundido com aproximadamente 20 mL de PBS para retirada do azul de Evans intravascular dos pulmões. O pulmão esquerdo foi, então, retirado para extração de azul de Evans, como descrito previamente, e o pulmão direito para realização de ensaio de mieloperoxidase (MPO) e citocinas como descrito posteriormente.

Resultados foram expressos como quantidade (em μg) de azul de Evans por 100 mg de tecido.

4.4 Determinação dos níveis de citocinas

Níveis de TNF-α, IL-10, CXCL1-3 (KC) e CCL2 (MCP-1) foram medidos no soro, no intestino e no pulmão dos animais de acordo com descrição feita em publicações de Souza et al. (2000 a , b) utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado.

Para dosagem de citocinas, amostras de tecido pulmonar (fragmento do pulmão direito) e de tecido intestinal, foram homogenizadas em uma solução tampão de fosfato ("*phosphate-buffered saline* – PBS") (0.4 M NaCl e 10 mM de $NaPO_4$) contendo inibidor de proteases (0.1 mM "*phenylmethilsulfonyl fluoride"*, 0.1 mM "*benzethonium chloride"*, 10 mM "EDTA" e 20 KI aprotinina A) e 0,05% "*Tween* 20", na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogenizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi usado para as dosagens, após centrifugação de 3.000 rpm durante 10 minutos à 4ºC (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). Soro foi obtido do sangue total (15 min à 37^o C seguidos de 30 min à 4^o C) e armazenado à -20^o C até analise posterior.

As amostras de soro e dos tecidos foram analisadas na diluição 1:3 em PBS.

Para a avaliação dos níveis de TNF-α, de IL-10, de CXCL1-3 (KC), e de CCL2 (MCP-1) foram utilizados kits comerciais adquiridos de R & D Systems.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo que a sensibilização ocorre durante 12 horas à 4º C. A reação é bloqueada com PBS acrescido de 1% de ovalbumina (Sigma). A reação é detectada pela incubação com streptovidina conjugada com peroxidase ("*HRP-Streptavidin*

Pharmingem" - 1:4000) e revelada com "OPD (*o-phenylenediamine dihidrocloride"* - Sigma). Após 30 minutos a reação é interrompida com H_2SO_4.

A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Os ensaios tem uma sensibilidade de 4 a 8 pg ml^{-1}.

4.5 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino e no fragmento do pulmão direito foi mensurada pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase como descrito anteriormente (Matos et al., 1999).

Sumariamente, fragmentos de intestino e de pulmão direito dos animais submetidos à I60R30 foram removidos e congelados a – 20ºC. Após o descongelamento, o tecido (1 g de tecido em 19 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0.1 M NaCl, 0.02 M $NaPO_4$, 0.015 M NaEDTA), utilizando-se um homogenizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos (Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado é submetido à lise hipotônica (15 mL de solução de NaCl 0.2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1.6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação o precipitado foi ressuspendido em tampão $NaPO_4$ 0.05 M (pH 5,4) contendo brometo de "*hexadecyltrimethylammonium* (HTAB)" 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos Eppendorf (Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos à 10.000 rpm e foi recolhido o sobrenadante. As amostras dos tecidos foram diluídas em PBS previamente à análise na razão 1:3.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspendido foi calculada pela medida pelas alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando "*tetramethylbenzidine*" (1.6 mM) e H_2O_2 (0.5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido e comparados com neutrófilos da cavidade peritonial igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade peritonial foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína 5%.

Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) como descrito acima e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase.

4.6 Quantificação de hemoglobina

O nível de hemoglobina foi usado como índice de hemorragia tecidual. Após lavagem e perfusão do intestino para remover excesso de sangue do espaço intravascular, uma amostra de aproximadamente 100 mg de intestino foi retirada e homogeneizada com reagente de cor Drabkin (Analisa, Belo Horizonte, Brasil) utilizando-se um homogenizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm (Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA USA) e filtrada com filtro Millipore Express PLUS disc PES phylic 0.22µm 13mm.(Númeo do catálogo: GPWP01300, Millipore Corporation, Billerica, MA , USA).

A solução resultante foi lida em leitor de ELISA a 520 nm (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). A curva padrão foi feita utilizando o padrão de hemoglobina. As concentrações utilizadas foram de 400 a 25 mg de hemoglobina.

Resultados foram expressos como quantidade (em μg) de hemoglobina por 100 mg de tecido

4.7 Zimografia

A atividade das MMPs foi mensurada através de zimografia de gelatina e caseína como descrito anteriormente (KLEINER & STETLER-STEVENSON 1994, FERNANDEZ-RESA et al. 1995).

Sumariamente, a técnica consiste em uma eletroforese das proteases através de gel descontinuo de poliacrilamida contendo o substrato enzimático (gelatina tipo II ou B-caseína). Após a eletroforese, a remoção de dodecil sulfato de sódio (SDS) do gel pela lavagem com solução de Triton-X 2,5 %, permite que as enzimas se renaturem e degradem seu substrato protéico. A coloração com azul de Commassie permite a identificação de bandas de atividade proteolítica, detectadas como bandas claras contra um fundo azul.

As atividades das gelatinases A e B foram analizadas em géis contendo gelatina (Gel de poliacrilamida 10,5% contendo 2,0 mg/mL de gelatina) e as estromelisinas em géis de B-caseína (Gel de poliacrilamida 10,5% contendo 2,0 mg/mL de B-caseína).

Desta forma, ao final do período de reperfusão (30 min), uma amostra de aproximadamente 100 mg de intestino foi retirada, homogeneizada e lisada pela adição de 1mL da solução de lise (1% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 20% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de $NaVO_3$, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, leupeptina e aprotinina), e deixada em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente o lisado foi transferido para

tubos de 1,6 mL e centrifugado a 12.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5417R por 15 minutos a 4°C. As proteínas totais foram quantificadas pela técnica de Bradford, utilizando-se uma solução de albumina de soro bovina (BSA) 1 mg/mL como padrão. A concentração das proteínas totais foi determinada por espectrofotometria através do "Kit Bio-Rad Assay" (Bio-Rad Laboratories USA) e lidas em leitor de ELISA a 595 nm (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os valores obtidos foram utilizados para normalizar os ensaios de zimografia.

Após o preparo dos géis, e montagem das placas com espassadores (Bio Rad Mini Protean II electrophoresis apparatus, Hercules, CA, USA) as amostras foram homogenizadas em igual volume de tampão de amostra 2 X (para 8ml, utilizamos 2,8 mL dH_2O; 1mL Tris-HCl 0,5M, pH 6.8;.8mL de glicerol; 3,2 mL SDS 10%; 0,2mL de Azul de bromofenol 0,2%) e as alíquotas normalizadas das proteínas totais foram fracionados nos géis. Na primeira canaleta de cada gel foi aplicado um padrão de peso molecular (Invitrogen) que inclui os seguintes pesos (185kDA, 98kDA, 52kDA, 31kDA e 17 kDA)

A eletroforese se processou a 90 volts e à 4ºC até que o marcador de azul de bromofenol atingiu a base do gel (5-7 horas) em tampão de corrida (Tris 250mM, glicina pH 8,3, 2,5M, SDS 1%). Após a eletroforese, o SDS foi removido do gel por três lavagens de 10 min, consecutivas, utilizando-se solução de Triton X-100 2,5%.

Após incubação a 37ºC "overnight" o gel foi corado com a seguinte solução: azul de Coomassie R250 0,25%, metanol 45% e ácido acético glacial 10% por 2 horas e tratado com a solução descorante contendo metanol 45% e ácido acético glacial 10% até o clareamento das bandas.

O gel foi analisado através do percentual de clareamento das bandas de MMPs e das respectivas pró-MMPs, identificadas de acordo com os pesos moleculares (PM) obtidos de dados da literatura (FERNANDES-RESA et al., 1994; SHEN et al., 2003, HELARY, C. et al, 2006).

4.8 Drogas, reagentes e aparelhos:

As seguintes drogas foram obtidas dos laboratórios Sigma (Sigma, St. Louis, USA).

"Albumin from chicken egg white" (Ovalbumina) Número CAS: 9006-59-1 Número catálogo A5253

"Aprotinin from bovine lung" (Aprotinina) Fórmula molecular: C284H432N84O79S7, Número CAS: 9087-70-1 Número catálogo A3428

"Hexadecyltrimethylammonium bromide" Fórmula molecular: CH3(CH2)15N(Br)(CH3)3, Número CAS: 57-09-0 Número catálogo H6269

"o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)" Fórmula molecular: C6H4(NH2)2·2HCl, Número catálogo 78440

Azul de bromofenol Formula molecular: C19H10Br4O5S, Número CAS 115-39-9 Número catálogo B0126

Azul de Coomassie R250 Formula molecular: C47H48N3NaO7S2. Número CAS: 6104-58-1 Número catálogo B0770

Azul de Evans, Fórmula molecular C34H24N6Na4O14S4 Número CAS: 314-13-6 Número catálogo E2129

BSA soroalbumina bovina Número catálogo:05473

Dodecil sulfato de sódio (SDS) Sodium dodecyl sulfate Formula: CH3(CH2)11OSO3Na, Número CAS: 151-21-3 Número catálogo L4390

Gelatina tipo II Gelatin Número CAS: 9000-70-8 Número catálogo G9382

Glicerol Formula molecular: HOCH2CH(OH)CH2OH, Número CAS: 56-81-5 Número catálogo G8773

Glicina Formula molecular: NH2CH2COOH, Número CAS: 56-40-6 Número catalogo G8898

Metanol Formula molecular: CH3OH, Número CAS: 67-56-1 Número catálogo M1770

Cloreto de metilbenzetônio *Benzenemethanaminium,N,N-dimethyl-N-(2-(2-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenoxy) ethoxy) ethyl)- , chloride* N,N-Dimethyl-N-(2-[2-(methyl-4-[1,1,3,3-tetramethylbutyl]phenoxy)ethoxy] ethyl) benzylammonium chloride Formula molecular $C_{28}H_{44}NO_2Cl$ *Número CAS:* 25155-18-4 Número catálogo M7379

Poliacrilamida Número CAS: 9003-05-8 Número catálogo 92560 (Fluka)

Reagente de Bradford Número catálogo B6916

SDS Sodium dodecyl sulfate Formula molecular: CH3(CH2)11OSO3Na, Número CAS: 151-21-3 Número catálogo L3771

Triton X-100 Formula molecular: 4-(C8H17)C6H4(OCH2CH2)nOH, n~10, Número CAS: 9002-93-1 Número catálogo 234729

Uretana, Fórmula molecular: NH2COOC2H5, Número CAS: 51-79-6 Número catálogo U2500

β-Caseina Número CAS: 9000-71-9 Número catálogo C6905

Os compostos *PKF242-484* e *PKF241-4*66 foram sintetizados pelo departamento de química (Novartis Pharmaceutical Corporation, Summit, NJ, U.S.A.).

A estrutura do *PKF242-484* é *"[(2S,3R)-N4-((S)-2,2-Dimethyl-1-methylcarbamoyl-propyl)-N1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-(4- methoxy-phenyl)-succinamide)"* e do *PKF241-466 "[(2S,3R)-N4-((S)-2,2-Dimethyl-1-methylcarbamoyl-propyl)-N1-hydroxy-2-hydroxy-methyl-3-phenyl-succinamide]"*. O veículo utilizado para diluição de ambos os compostos foi o PBS estéril.

Os compostos *PKF242-484*, *PKF241-466* (0.1 a 10 mg/kg) foram administrados intravenosamente (i.v.) 10 min antes da reperfusão. A seleção de doses foi baseada em estudo *in vivo* dos inibidores de TACE realizado por Trifilieff et al. (2002). O tampão fosfato (*phosphate-buffered saline* - PBS) estéril foi utilizado na diluição de todos os compostos

O composto FN-439 foi sintetizado por Calbiochem (Calbiochem, La Jolla, USA). Trata-se de um inibidor de várias MMP à saber, MMP 1, 3, 8 e 9 (HAGEMANN et al, 2004; ODAKE et al., 1994). O veículo utilizado para diluição foi o PBS estéril. A estrutura do FN-439 é "*{[4-Abz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NH-OH] [Abz = aminobenzoyl]}* " Formula molecular $C_{23}H_{34}N_6O_6$.

O composto *NF-43*9 (10 mg/kg) foi administrado intravenosamente (i.v.) 10 min antes da reperfusão. A escolha da dose foi baseada e em estudo *in vivo* dos inibidores MMP realizado por Falo et al (2006). O tampão fosfato (*phosphate-buffered saline* - PBS) estéril foi utilizado na diluição deste composto.

O veículo utilizado nos animais I/R também foi o PBS estéril administrado intravenosamente (i.v.) 10 min antes da reperfusão.

O composto Tris (Hydroxymethyl)aminomethane, Número CAS 77-86-1. Calbiochem RTECS TY2900000 também foi sintetizado por Calbiochem (Calbiochem, La Jolla, USA).

A streptovidina conjugada com peroxidase foi obtida junto à Pharmingem (BD Pharmingen™, NJ, USA). "*Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SAv-HRP (HRP-Streptavidin)"* Número catálogo 554066.

Reagente de cor Drabkin foi adquirido de Analisa (Analisa, Belo Horizonte, Brasil).

Demais drogas utilizadas adquiridas de LABSYNTH PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS (BH, MG, Brasil) ou VETEC QUIMICA FINA LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

"Carbamaldehyde" Formamida Fórmula molecular CH3NO Número CAS: 75-12-7.

"*EthyleneDiamineTetrAcetic acid*" EDTA.(ácido etilenodiamino tetra-acético).

"Phenylmethilsulfonyl fluoride" Formula molecular C7H7FO2S Número CAS 329-98-6.

"Tetramethylbenzidine - 3,3',5,5'-tetramethylbiphenyl-4,4'-diamine" Fórmula molecular C16H20N2 Número CAS: 54827-17-7.

"Tween 20, polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate" Outras denominações *"Polysorbate 20 PEG (20) sorbitan monolaurate"* Fórmula molecular C58H114O26 Número CAS: 9005-64-5.

Ácido acético, Ácido metanocarboxílico Fórmula molecular: C2H4O2 ou CH3COOH Número CAS 64-19-7

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4. Ácido sulfúrico

NaCl Cloreto de sódio

$NaPO_4$ Fosfato de sódio

Kits de anticorpos foram adquiridos de R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, USA) para mensuração das seguintes substâncias / (número

catálogo) de TNF-α/ (MTA00), IL-10/ (M1000), CXCL1-3 (KC)/ (MKC00B) e CCL2 (MCP-1)/ (MJE00).

4.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As porcentagens de inibição foram calculadas através da subtração dos níveis de basais (obtidos em animais sham) em relação aos animais controle e tratados.

As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizado o teste t de student.

Software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.10 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica e a obtenção de artigos em formato eletrônico foi feita através da base de dados do portal Medline/Pubmed, no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

A obtenção de artigos em formato eletrônico também foi feita através da base de dados do portal Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes/Mec), no endereço: <http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>

Foram avaliados artigos originais, de revisão ou atualização e capítulos de livros-texto, conforme sua relevância para o tema de estudo, escritos em português, inglês, francês e espanhol.

As palavras-chaves utilizadas foram: *"TNF, TACE, inflammation, systemic inflammatory response syndrome, ischemia, reperfusion, isquemia/reperfusion, intestine, neutrophil(s), cytokine(s), chemokine(s), MMP, FN-439 e zymography".*

5. RESULTADOS

5 Resultados

As lesões que acompanham a I/R intestinal no modelo em camundongos dependem da ação da TACE sobre o TNF-α ?

5.1 Efeitos dos tratamentos com *PKF242-484 ou PKF241-466* na letalidade e na elevação dos níveis séricos de TNF-α.

Elevadas taxas de mortalidade que ocorrem após a isquemia e reperfusão intestinal parecem se correlacionar com a elevação sérica de TNF-α segundo Souza et al. (2002). Animais que receberam *PKF242-484 ou PKF241-466* (inibidores de TACE) apresentaram uma redução acentuada das concentrações de TNF-α no soro (FIG. 1). Podemos notar que o efeito foi dose-dependente, com inibição máxima obtida com a dose de 10 mg/kg em nosso experimento.

Ambos os compostos apresentaram efeitos na letalidade, também de maneira dose-dependente (FIG. 2). Podemos observar que houve prevenção e retardo da letalidade que acompanha as lesões de reperfusão com o uso de *PKF241-466* e *PKF242-484,* respectivamente.

O grupo tratado apenas com veículo teve 100% de letalidade até 60 minutos de reperfusão enquanto 20% dos animais tratados com 10 mg/kg de PKF242-484 i.v. e 50% dos animais submetidos ao tratamento com 10

mg/kg de PKF241-466 EV sobreviveram até o ponto de corte de 120 minutos (FIG. 2 A, B).

Como houve inibição significativa da produção de TNF-α com a dose de 10 mg/kg (P< 0,001 em relação ao veículo), essa dose foi utilizada em todos os demais experimentos.

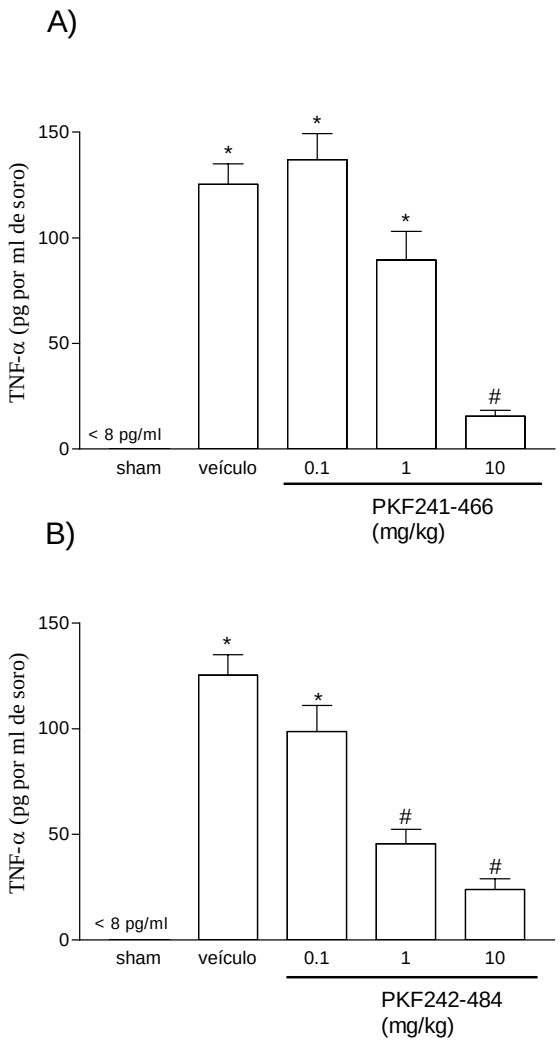

Figura 1: Efeito do tratamento com PKF241-466 (A) ou PKF242-484 (B) nas concentrações séricas de TNF-α solúvel em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). TNF-α foi mensurado por ELISA específico. PKF242-484 ou PKF241-466 (0.1-10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como pg de TNF-α por ml de soro e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para P< 0,01 quando comparado com animais sham-operados e # para P< 0,05 quando comparados com animais do grupo I/R.

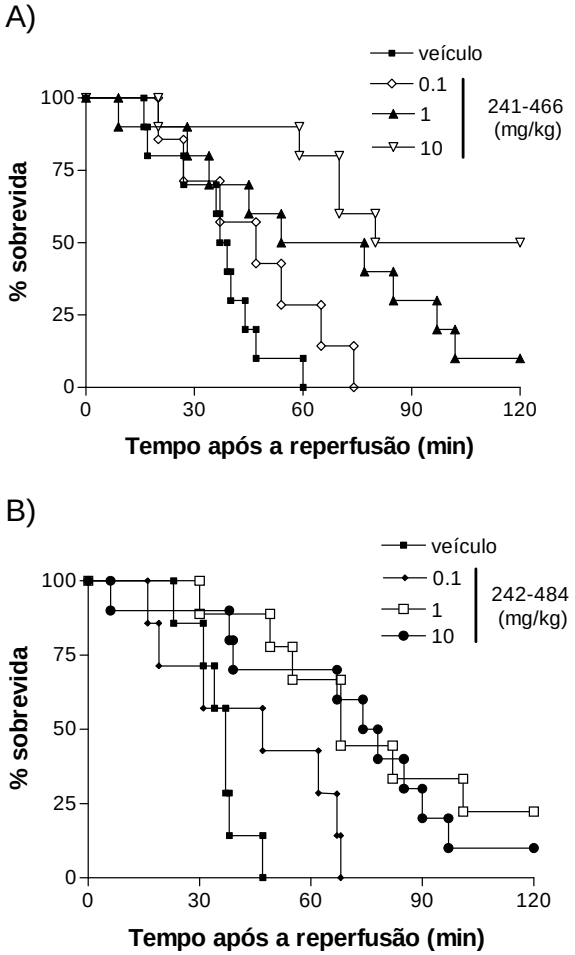

Figura 2: Efeitos dos tratamentos com PKF241-466 (A) ou PKF242-484 (B) na letalidade em modelo de lesão intestinal de isquemia e reperfusão. Camundongos (n= 7-10 em cada grupo) foram anestesiados e submetidos à ligadura da artéria mesentérica superior por 60 minutos. Após esse período a perfusão foi re-estabelecida e a sobrevida monitorada. PKF242-484 (0.1-10 mg/kg) ou PKF241-466 (0.1-10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. A sobrevida dos animais tratados com a dose de 10 mg/Kg de ambos os compostos foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação ao grupo que recebeu apenas o veículo

Agentes inibidores da TACE são capazes de alterar os parâmetros inflamatórios nessas lesões?

5.2 Efeitos dos tratamentos com *PKF242-484 ou PKF241-466* na nas lesões teciduais locais e à distância

A administração de *PKF242-484* ou *PKF241-466* 10 minutos antes da reperfusão da artéria mesentérica superior aboliu as alterações de permeabilidade vascular conseqüentes à lesão de isquemia e reperfusão no intestino e nos pulmões, avaliadas através da redução da intensidade do corante azul de Evans nesses tecidos (FIG. 3 A, B). As duas drogas também foram capazes de reduzir acentuadamente a migração de neutrófilos para o intestino e o pulmão de animais submetidos à isquemia e reperfusão (FIG.3 C, D).

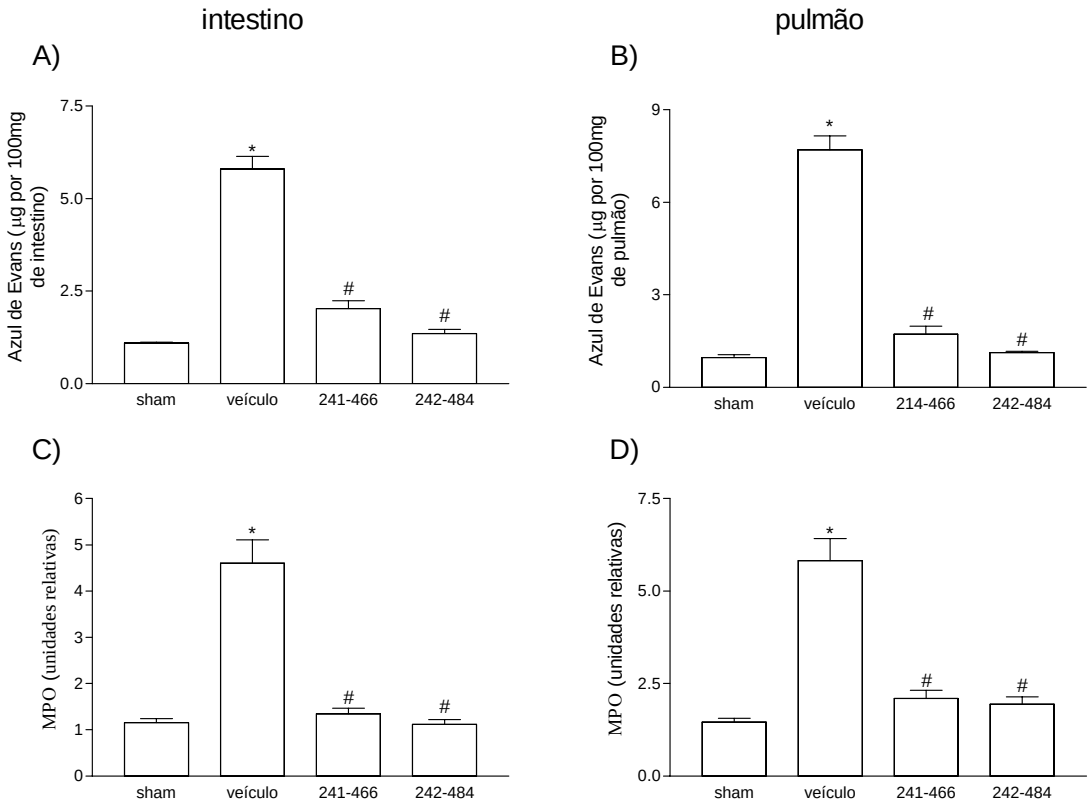

Figura 3: Efeito do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 na permeabilidade vascular (A, B), migração de neutrófilos (C, D) em intestino e pulmão, respectivamente em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). As alterações de permeabilidade vascular foram avaliadas pela mensuração do extravasamento do corante azul de Evans. A migração de neutrófilos foi avaliada pela mensuração dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). PKF242-484 ou PKF241-466 (10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como µg de azul de Evans por 100 mg de tecido ou número de neutrófilos por 100 mg de tecido e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para P< 0,01 quando comparado com animais sham-operados e $^{\#}$ para P< 0,05 quando comparados com animais do grupo I/R.

Além disso, a concentração intestinal de hemoglobina, um indicador indireto de hemorragia tecidual, foi marcadamente reduzida em animais tratados com os inibidores da TACE (FIG. 4).

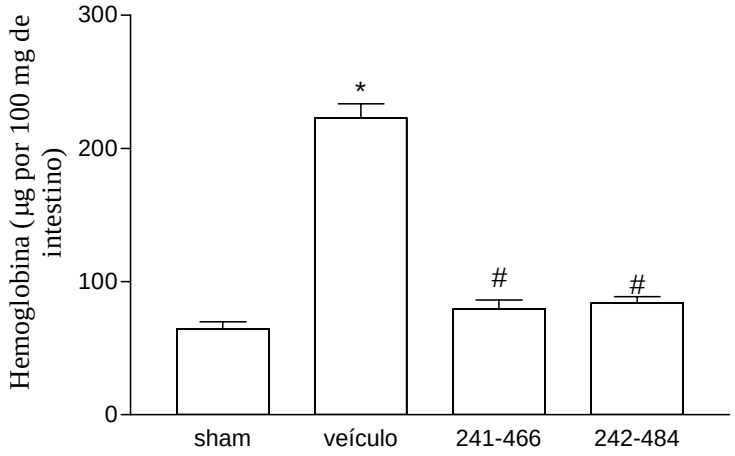

Figura 4: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 no conteúdo intestinal de hemoglobina em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). A hemorragia tecidual foi avaliada pelos níveis teciduais de hemoglobina. PKF242-484 ou PKF241-466 (10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como µg de hemoglobina por 100 mg e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para P< 0,01 quando comparado com animais sham-operados e $^{\#}$ para P< 0,05 quando comparados com animais do grupo I/R.

Existe participação de outras citocinas/quimiocinas, particularmente a IL-10 nesse processo?

5.3 Efeitos do tratamento com *PKF242-484 ou PKF241-466* nas concentrações teciduais de citocinas e quimiocinas.

Os níveis de citocinas (TNF-α e IL-10) e quimiocinas (KC/CXCL1-3 e MCP-1/CCL2) foram medidos no intestino e no pulmão ao final de 30 minutos de reperfusão. A administração de *PKF242-484 ou PKF241-466* reduziu significativamente o aumento induzido pela reperfusão nos níveis teciduais de TNF-α (FIG. 5 A, B).

De maneira similar, o tratamento com *PKF242-484 ou PKF241-466* reduziu os níveis de KC e MCP-1 no intestino e nos pulmões de animais submetidos à reperfusão (FIG. 6 A-D).

Em contraste, nem o *PKF242-484 ou PKF241-466* foram capazes de alterar os níveis teciduais da citocina anti-inflamatória IL-10 (FIG. 7).

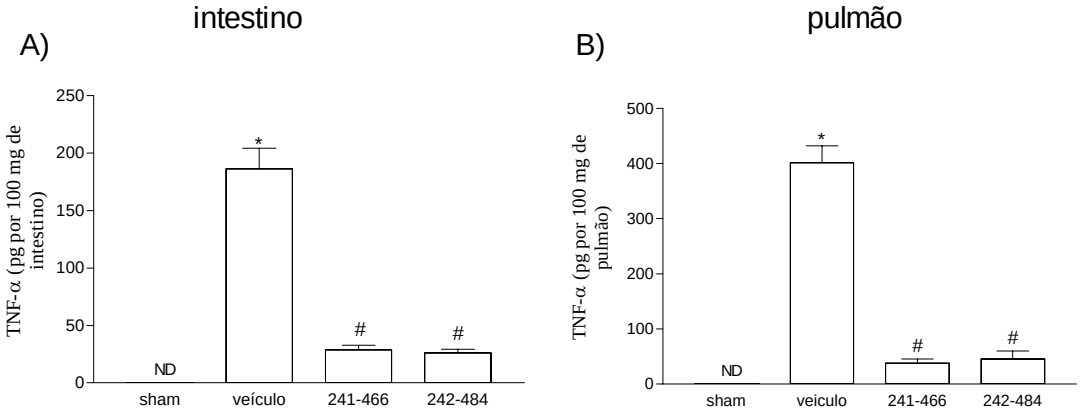

Figura 5: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de TNF-α no intestino (A) e no pulmão (B) em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). As concentrações de TNF-α foram mensuradas por ELISA específicos no intestino e pulmão. PKF242-484 ou PKF241-466 (10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como pg de TNF-α por 100 mg de tecido e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para P< 0,01 quando comparado com animais sham-operados e # para P< 0,05 quando comparados com animais do grupo I/R.

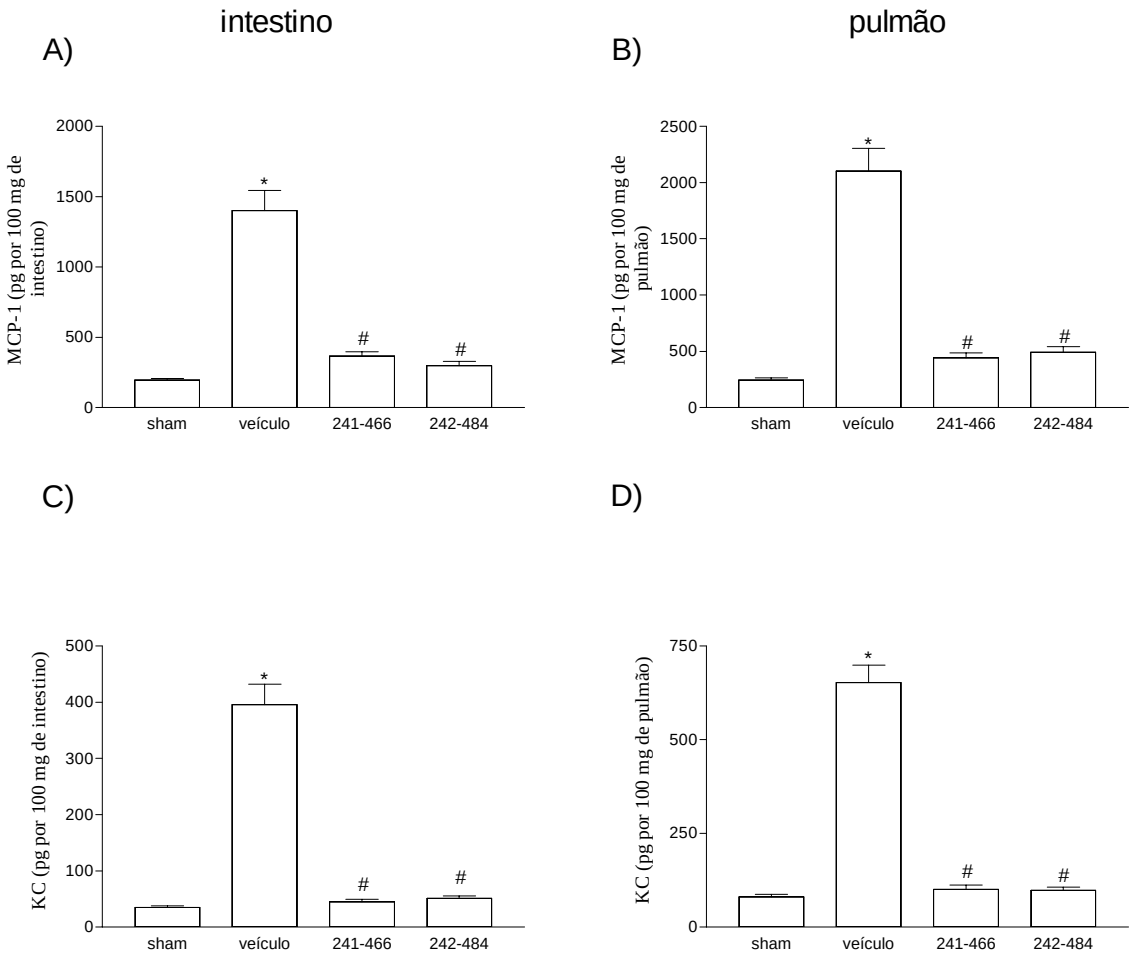

Figura 6: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de MCP-1 (A,B) e KC (C,D) no intestino e no pulmão em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). As concentrações de MCP-1 ou KC foram mensuradas por ELISA específicos no intestino e pulmão. PKF242-484 ou PKF241-466 (10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como pg de MCP-1 ou KC por 100 mg de tecido e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para P< 0,01 quando comparado com animais sham-operados e $^{\#}$ para P< 0,05 quando comparados com animais do grupo I/R.

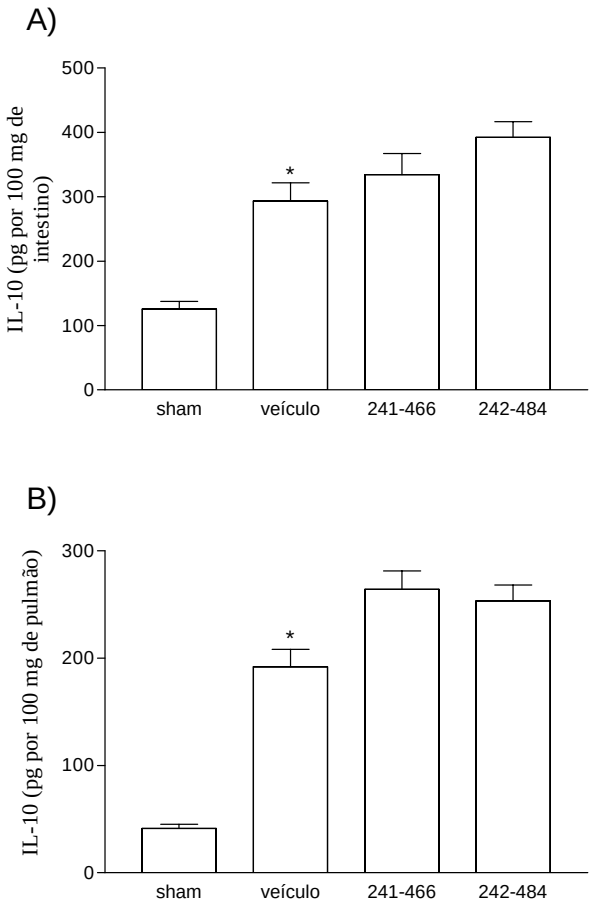

Figura 7: Efeitos do tratamento com PKF242-484 ou PKF241-466 nas concentrações de IL-10 no intestino e no pulmão em modelo de lesão intestinal de isquemia (60 min) e reperfusão (30 min). As concentrações de IL-10 foram mensuradas por ELISA específico no intestino (A) e pulmão (B). PKF242-484 ou PKF241-466 (10 mg/kg) ou veículo foram administrados i.v. 10 minutos antes da reperfusão. Resultados são apresentados como pg de IL-10 por 100 mg de tecido e são média ± DP com média de 5-6 animais por grupo. * para

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

As lesões de isquemia e reperfusão (I/R) têm um impacto significativo na morbi/mortalidade em nossa sociedade. Segundo dados da Organização mundial de saúde (WHO) doenças que cursam com I/R causam atualmente cerca de 16,7 milhões de mortes/ano (29,2% do total de óbitos - dados de 2003). Cerca de 80% destas mortes ocorrem em países em desenvolvimento e estima-se que até 2010 essas doenças serão as principais causa de morte nesses locais. Além disso, aproximadamente 20 milhões de pessoas/ano sobrevivem a essas doenças resultando em enormes gastos para o sistema de saúde devido à necessidade de cuidados clínicos contínuos. Sabemos que terapêuticas farmacológicas podem alterar a evolução destas lesões (WANG, et al., 2002) sendo bastante pertinente a pesquisa de compostos que influenciam o resultado das lesões de I/R.

Especificamente em nosso modelo, a reperfusão do território vascular irrigado pela artéria mesentérica superior em camundongos foi seguida por grave lesão local (intestino) e à distância (pulmões). Essa lesão foi caracterizada por migração de neutrófilos, alteração da permeabilidade vascular, hemorragia e destruição tecidual (conforme demonstrado aqui e em SOUZA et al., 2002). Não existe apenas dano tecidual, mas também podemos notar uma resposta inflamatória acentuada, caracterizada pela

elevação dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias. Vários estudos demonstram claramente o papel do TNF-α mediando tanto as lesões locais como a inflamação sistêmica que acompanha as lesões de I/R (GILMONT et al., 1996; COLLETTI et al., 1998; SOUZA et al., 2001, 2002; BELOSJOROW et al., 2003).

Para avaliar se a liberação de TNF-α era dependente da ação da TACE em nosso modelo e se a inibição da TACE poderia prevenir as respostas inflamatórias associadas às lesões de I/R, utilizamos *PFK242-484* e *PFK241-466*, dois inibidores duais da TACE e das metaloproteinases de matriz (TRIFILIEFF et al., 2002). Esses agentes foram capazes de inibir a liberação de TNF-α *in vitro* em culturas de células mononucleares humanas, além se serem capazes de inibir várias MMPs (à saber: MMP 1, 2, 3, 9, 13 e a colagenase murina). Esses agentes também reduziram parâmetros inflamatórios em modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida por LPS ou ovoalbumina, ainda segundo Trifilieff et al. (2002).

O tratamento com *PFK242-484* ou *PFK241-466*, após o inicio da isquemia e imediatamente antes da reperfusão da artéria mesentérica superior foi capaz de inibir de maneira dose-dependente a liberação de TNF-α no soro e em tecidos. A inibição do TNF-α solúvel esteve associada à inibição da lesão tecidual e ao atraso ou prevenção da letalidade. De maneira geral não observamos uma diferença significativa de potência ou eficácia entre *PFK242-484* e *PFK241-466*, porém testamos apenas um pequeno número de doses.

Estratégias que reduzem a migração do neutrófilo são sabidamente preventivas na lesão induzida pela reperfusão. Esse efeito foi demonstrado tanto em modelos animais como em humanos (SISLEY et al., 1994). Em nossos experimentos, a inibição do TNF-α solúvel por *PFK242-484* ou *PFK241-466*, esteve associada a uma significativa redução na migração de neutrófilos e na produção da quimiocina KC, da família CXC, sabidamente ativadora de neutrófilos. Quimiocinas da família CXC são capazes de ativar CXCR2 da superfície do neutrófilo e são essenciais para a sua migração durante as lesões de isquemia e reperfusão (SOUZA et al., 2004a). Além disto, trabalhos anteriores de nosso laboratório e de outros autores demonstraram que a liberação de quimiocinas CXC pelo neutrófilo é dependente de TNF-α (SOUZA et al., 2002; OHMORI et al., 1993). Desta forma, a habilidade do *PFK242-484* ou *PFK241-466* em prevenir a liberação de TNF-α solúvel e conseqüentemente prevenir a produção de KC poderia ser uma das causas que contribuíram para os efeitos observados na migração de neutrófilos.

Corroborando com esses achados, inibição da TACE foi acompanhada de diminuição da produção de quimiocinas CXC em modelo de lesão pós-transplante pulmonar e por redução dos parâmetros inflamatórios em modelos de inflamação peritonial ou pulmonar induzidos pelo LPS e em modelos de artrite induzida por colágeno ou polímeros de peptideoglicano (GOTO et al., 2004, NEWTON et al. 2001, ZHANG et al., 2004 e CONWAY et al.,2001). Desta

forma, a prevenção da liberação/clivagem do TNF-α, a redução da produção de KC dependente de TNF-α e prevenção da migração neutrofílica podem ser a base dos efeitos benéficos observados com o uso de *PFK242-484* ou *PFK241-466* nesse modelo de lesão de isquemia e reperfusão intestinal.

Outros estudos demonstram que a inibição da liberação/clivagem do TNF-α pela TACE resulta em redução de lesões de reperfusão em outros leitos vasculares como o cérebro (WANG et al., 2004) e coração (GILLES et al., 2003).

Entretanto a TACE é capaz de atuar sobre outros substratos. Conforme revisto por Mezyk et al. (2003) a TACE tem como substratos moléculas que participam do desenvolvimento e da diferenciação como vários fatores de crescimento, dentre eles o fator transformador de crescimento (TGF-α), (PESCHON et al.,1998), várias moléculas do sistema imune como ambos os receptores de TNF (PESCHON et al.,1998; REDDY et al.,2000), o receptor 2 para IL-1 (IL-1RII) (REDDY et al., 2000), a L-selectina (PESCHON et al.,1998), a fractalkina, (GARTON et al., 2001) o receptor alfa para IL-6 (IL-6Rα) (ALTHOFF et al., 2000), VCAM-1 (GARTON et al., 2003) e ICAM-1 (TSAKADZE et al., 2005). Ainda existe debate na literatura sobre a importância da atuação da TACE em substratos descritos acima.

Acredita-se que a clivagem dos receptores de TNF-α pode reduzir a resposta celular a essa citocina (PORTEU & NATHAN, 1990). Outros autores sugerem que a elevação das concentrações de receptores solúveis poderia

reduzir os efeitos do TNF-α solúvel devido à sua afinidade de ligação com essas moléculas (ADERKA et al., 1992), impedindo sua ligação com receptores expressos na membrana.

Alguns trabalhos demonstram que os níveis séricos destes receptores podem aumentar a ação do TNF-α devido à estabilização da citocina impedindo seu decaimento (VAN ZEE et al., 1992; ADERKA, 1996). Estes receptores podem ainda iniciar efeitos sinalizadores através de sua ligação ao TNF-α transmembrana, principalmente em situações inflamatórias. Sabe-se que a superfamília TNF/TNFR é capaz de sinalizar não apenas via receptor, mas também via ligante, fenômeno conhecido como "sinalização reversa". Waetzig et al. (2004) sugere que a forma solúvel do TNFR-I pode induzir a apoptose de monócitos através de sinalização reversa. Infelizmente não investigamos de maneira sistemática o papel da inibição da TACE na clivagem de outros substratos em nosso modelo. Por outro lado é razoável sugerir que a prevenção da migração de neutrófilos e das lesões teciduais observadas com o uso de *PFK242-484* ou *PFK241-466* seja devido à habilidade destes compostos em inibir a TACE e conseqüentemente à inibição dos mediadores solúveis clivados por essa enzima, dentre eles o TNF-α.

Além de seus efeitos nas lesões teciduais induzidas pela reperfusão e na liberação / clivagem do TNF-α, *PFK242-484* ou *PFK241-466* retardaram ou preveniram de maneira dose-dependente a letalidade associada à reperfusão. De fato, existe uma correlação estreita entre a habilidade de

ambos os compostos em reduzir as concentrações de TNF-α sistêmicas e a prevenção/retardo da letalidade. Esse dado é consistente com observações prévias que demonstram que a concentração sérica de TNF-α é um preditor de mortalidade nesse modelo (SOUZA et al., 2001). Kermarrec et al., (2005) demonstram a importância da TACE em pacientes com sepse abdominal. Níveis séricos e peritoniais de TNF-α , TNFR I e II e L-selectina, estavam aumentados em pacientes sépticos quando comparados com controles saudáveis. Eles ainda observaram que os níveis séricos de TNFRII e expressão de TACE na membrana de PMN estavam correlacionados com a sobrevida destes pacientes.

Acredita-se que estratégias que impeçam a elevação dos níveis séricos de TNF-α estão associadas à redução da letalidade (SOUZA et al., 2001, 2002, 2005b). Assim, a inibição da produção sistêmica de TNF-α parece explicar a habilidade de ambos os compostos em retardar e prevenir a letalidade. Não encontramos na literatura outro relato onde a inibição dual da TACE e MMPs está associado à redução da letalidade associada á reperfusão.

Em contraste com a inibição da lesão tecidual e da produção de mediadores pró-inflamatórios, nem *PFK242-484* ou *PFK241-466* foram capazes de modular a produção de IL-10 induzida pela reperfusão. Sabe-se que a IL-10 é capaz de reduzir a liberação do TNF-α *in vivo* (GERARD et al., 1993; MARCHANT et al., 1994). Foi postulado por alguns autores, dentre

eles Leeuwenberg et al. (1994) e Joyce & Steer (1996) que a IL-10 pode aumentar a liberação de TNFR II solúvel, reduzindo assim os níveis séricos de TNF-α. Outro mecanismo proposto seria a capacidade da IL-10 de induzir a expressão de *Bcl-2* impedindo assim a apoptose celular (WEBER et al., 1996; DAEMEN et al., 1998).

Vários estudos demonstram que a IL-10 é um importante modulador da lesão tecidual após lesões de isquemia e reperfusão (LANE et al., 1997; ZINGARELLI, 2002; SOUZA et al., 2003a, 2004c). Além disso, podemos observar que várias estratégias que limitam a lesão tecidual, incluindo o bloqueio de receptores da bradicinina e do PAF, estão associados a um aumento da produção de IL-10 (SOUZA et al.,2003b,c, 2004b).

Várias situações terapêuticas empregadas durante a isquemia e reperfusão, cursam com inibição da liberação de TNF-α seguida de aumento da produção de IL-10 e inibição da lesão IL-10-dependente. Entretanto tal fato não foi observado com o uso destes compostos. Esse mecanismo também não parece estar envolvido nos efeitos benéficos observados com o uso de anticorpos anti-TNF-α (SOUZA et al., 2001), antagonistas do CXCR2 (SOUZA et al., 2004a) ou com o uso de inibidores do complemento (SOUZA et al., 2005a). Nossos resultados sugerem que a IL-10 não contribuiu para os efeitos benéficos de *PFK242-484* ou *PFK241-466* nesse modelo de lesões intestinais associados à isquemia e reperfusão

Como *PFK242-484* ou *PFK241-466* também são capazes de inibir MMPs além de seus efeitos sobre a TACE, fez-se presente a necessidade de avaliar se existia ou não participação da inibição das MMPs nos efeitos observados nesse modelo de lesão secundária à isquemia e reperfusão intestinal.

Neutrófilos ativados também liberam metaloproteinases. Essas enzimas geralmente não são expressas em tecidos saudáveis, mas podem ser secretadas por macrófagos, neutrófilos e linfócitos durante a resposta inflamatória, e por vários tipos celulares em processos de cicatrização, doenças e tumores (PARKS et al., 2004). As MMPs são secretadas ou podem ser expressas na membrana celular (MT-MMPs) (RUTHSHOW et al., 2006). Funcionalmente as MMPs podem ser subdivididas de acordo com seu substrato em três diferentes grupos: As colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são capazes de decompor as fibras insolúveis de colágeno em moléculas solúveis. A clivagem desses subprodutos do colágeno é feita pelas gelatinases (MMP-2 e 9). A MMP-2 parece ser expressa constitutivamente enquanto a MMP-9 parece estar relacionada à inflamação e é expressa em neutrófilos e macrófagos. (NAGAOKA & HIROTA, 2000; TAO et al., 2004). O terceiro grupo denominado "semelhantes a estromelisina" *("stromelysin-like")* - como a MMP-3 é capaz de degradar vários componentes da ECM além de ser capaz de ativar formas inativas de MMPs. Neste grupo estão as MMPs ligadas à membrana.

Essas enzimas passaram a ser vistas de maneira distinta ao perceber-se que os peptídeos fragmentados da ECM possuíam atividade biológica (SCHENK & QUARANTA, 2003; MOTT & WERB, 2003). Além disto, as MMPs tem capacidade de atuar sobre outros substratos liberando citocinas, receptores e moléculas de adesão (DIEKMANN & TSCHESCHE, 1994; FOWLKES et al.,1994; KRIDEL et al., 2001). Pouco ainda se sabe sobre a ativação das MMPs. Ela pode ser feita por MT-MMPs ou MMP-3, radicais livres, porém o sistema do plasminogênio tem papel importante como os fatores ativadores do plasminogênio ("plasminogen activators – (PA)"), ativador do plasminogênio de tipo tecidual ("tissue-type PA (t-PA)"), o ativador do plasminogênio de tipo uroquinase ("urokinase-type PA - (uPA)") e os inibidores da ativação do plasmonogênio ("PA-inhibitor (PAI)"), (HE et al., 1989).

A atuação das MMPs sobre mediadores inflamatórios pode se dar de maneira direta ou indireta. Elas podem clivar quimiocinas resultando em ativação, inativação ou antagonismos (McQUIBBAN et al, 2001, 2002; VAN DEN STENN et al., 2000). Elas também podem, de maneira indireta, agir sobre substratos aos quais se ligam as quimiocinas, concentrando ou diluindo moléculas quimiotáticas (LI et al., 2002).

Sabemos que as MMPs 1, 3, 13 e 14 são capazes de antagonizar os efeitos de MCP-1, MCP-2 e MCP-4 pela clivagem da cadeia N-terminal (McQUIBBAN et al, 2002). Além do efeito sobre as MCPs, outras quimiocinas

da família CC ou da CXC também são alteradas pela ação enzimática das MMPs. A MMP-9 é capaz de inativar várias citocinas como CXCL5 e CXCL6, porém aumenta a capacidade quimiotática de CXCL8 (VAN DEN STENN et al., 2000).

As MMPs também podem regular as quimiotaxias de maneira indireta. Li et al. (1995) observaram que a MMP-7 derivada de células epiteliais pulmonares clivava um sulfato de protoheparan de superfície celular gerando uma molécula denominada "*syndecan-1*". A ação coordenada de três fatores derivados da célula epitelial, a MMP-7, o proteoglicano "*syndecan-1*" e a quimiocina CXCL-1 (KC) agiam coordenadamente no intuito de controlar e confinar a migração de neutrófilos para os locais de lesão. Em resposta à lesão, a célula epitelial era capaz de sintetizar, secretar e depositar KC nas cadeias pré-existentes de "*syndecan-1*" ligadas á membrana. A MMP-7, também produzida pela lesão, clivava o complexo quimiocina/"*syndecan-1*" gerando assim um gradiente quimiotático. Estudos em lesões pulmonares induzidas pela bleomicina com animais deficientes em MMP-7 demonstram que os neutrófilos foram capazes de extravasar dos vasos, mas ficaram retidos na interface epitelial-intersticial ou em espaços peri-vasculares expandidos, e não foram capazes de entrar nos alvéolos pulmonares.

As citocinas também são substrato das MMPs. A IL-1β, uma potente citocina pro-inflamatória necessita de ativação proteolítica para sua ativação, um processo atribuído à enzima conversora de IL-1β (ICE ou caspase-1).

Entretanto estudos demonstram que pelo menos três MMPs (MMP-2, 3 e 9) também podem clivar e ativar a IL-1β (SCHONBECK et al., 1998). Porém, uma vez ativada, a IL-1β passa a ser um substrato para essa mesmas enzimas. Schonbeck et al. (1998) notaram a inativação da IL-1β *in vivo* pela MMP-3. Ito et al.(1996) já haviam demonstrado a inativação *in vitro* pelas MMPs 3 e 9 e mais fracamente pela MMP-2. Esses dados demonstram o papel dual das MMPs na modulação bifásica da atividade inflamatória.

Apesar da TACE ser a principal responsável pela clivagem do TNF, estudos *in vitro* demonstram a capacidade de outras MMPs (notadamente MMP-1, 2, 3, 9 e 17) em clivar o pró-TNF (ENGLISH et al, 2000). Haro et al. (2000) e Churg et al. (2003), utilizando células de camundongos deficientes em TACE demonstraram que a MMP-7 e MMP-12 também ativam o pró-TNF em macrófagos. Desta forma, acredita-se que a TACE esteja envolvida na liberação de grandes quantidades de TNF induzida por vários estímulos, enquanto que outras MMPs, particularmente MMP-7 e MMP-12 estejam envolvidos na liberação constitutiva de níveis basais de TNF em macrófagos. Esse TNF parece ser necessário para funções rotineiras como processos de reabsorção e resolução da resposta inflamatória (PARKS et al., 2004).

Vários estudos (BASILE et al., 2004; MAGNONI et al., 2004; ROSARIO et al., 2004) demonstram que as MMPs são expressas durante a isquemia e reperfusão e podem desempenhar um papel importante (ROMANIC et al., 2002; SOCCAL et al., 2004). Delclaux et al. (1996) já haviam demonstrado

que a MMP-9 tem papel crucial na migração de neutrófilos através da membrana basal *in vitro*.

O uso do inibidor de MMPs *FN-439* não foi capaz de reduzir os níveis séricos de TNF-α nem demonstrou nenhum efeito significativo sobre a letalidade nas lesões de reperfusão intestinal.

A ação deste inibidor não foi capaz de reduzir os danos teciduais ou os parâmetros inflamatórios associados às lesões de isquemia e reperfusão intestinal, como podemos observar pela ausência de diferença entre as dosagens de hemoglobina, de azul de Evans e de MPO do grupo I/R veículo e do grupo que recebeu o *FN-439.* Devemos lembrar que a dose utilizada foi eficaz em inibir a atividade das MMPs, conforme evidenciado por estudo *in vivo* realizado por Falo et al. (2006) e pela zimografia (FIG 9 e 10). Apesar do uso do *FN-439* em nosso modelo ter acentuado as alterações de permeabilidade vascular e a hemorragia, não houve diferença estatística entre esse grupo e o grupo I/R.

A inibição da atividade de MMP-3 ocorreu de maneira esperada de acordo com os dados da literatura (FERNANDES-RESA et al., 1994; SHEN et al., 2003, HELARY, C. et al, 2006). Entretanto, uma discreta inibição da atividade de MMP-2 também foi observada com o uso do *FN-439*. Segundo as referências disponíveis para essa molécula, o *FN-439* não possui ação inibitória direta sobre a MMP-2 (HAGEMANN et al, 2004; ODAKE et al., 1994). Esse composto apresenta, entretanto, inibição da MMP-3 conforme os

autores anteriormente citados e confirmado por nossos achados apresentados na FIG. 9. Parks (2004) sugere que a MMP-3 é a principal responsável pela ativação de todas as demais MMPs. Acreditamos que a discreta redução da atividade da MMP-2, observada em nosso modelo, pode ser explicada através da inibição de sua ativação pela MMP-3, que por sua vez foi inibida pela à ação do *FN-439*.

Baseado nas observações de inibição da atividade de MMPs nesse modelo, podemos supor que a diferença observada na letalidade entre o tratamento com *PFK242-484* e *PFK241-466* pode ser devida à potência do primeiro composto em inibir a atividade das MMPs, particularmente a MMP-3, contribuindo negativamente para a sobrevida destes animais. Isto poderia explicar porque o *PFK242-484*, apesar de ser um inibidor da TACE mais potente do que o *PFK241-466* , apresentou maior letalidade.

Em resumo, o conjunto de dados apresentados aqui sugere que os efeitos benéficos observados com a utilização de inibidores duais da TACE e de metaloproteinases de matriz se devem primariamente à inibição da clivagem do TNF associada ou não à inibição da MMP. Entretanto, a inibição isolada das MMP não altera as lesões de isquemia e reperfusão intestinais nesse modelo.

7. CONCLUSÃO

7 Conclusão

Esse estudo demonstra que *PFK242-484* ou *PFK241-466,* novos compostos inibidores duais da TACE e de MMPs são efetivos em reduzir o dano local e remoto, a reposta inflamatória sistêmica e a letalidade que acompanha as lesões de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior em camundongos.

A inibição das MMPs pelo *FN-439* não foi capaz de reduzir a letalidade, a resposta inflamatória sistêmica e o dano local, além de acentuar as alterações de permeabilidade capilar locais nas lesões de reperfusão intestinais.

Concluímos que o efeito de inibidores duais da TACE e de MMPs parece estar correlacionado com a capacidade de inibição da clivagem do TNF-α nesse modelo e não à inibição das MMPs.

Desta forma, o uso de compostos como o *PFK242-484* ou *PFK241-466* pode ser um tratamento coadjuvante efetivo em lesões de reperfusão que se seguem à isquemia de territórios vasculares.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H. (2003). **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed. Philadelphia, Elsevier, updated 2005.

ADERKA D. et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. **J Exp Med**., Feb 1,175(2),p 323-9, 1992.

ADERKA D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**., Oct 7(3),p 231-40, 1996.

ALTHOFF K. et al. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins **Eur J Biochem.,** May;267(9),p 2624-31, 2000.

AMBROSIO G., FLAHERTY JT., DUILIO C. Oxygen radicals generated at reflow induced peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts.**J. Clin. Invest.**, 87,p 2056-2066,1991.

AMBROSIO, G..; TRITTO, I. Reperfusion injury, Experimental evidence and clinical implications. **Am. Heart. J**., 138,p S69-S75. 1999.

ARMSTRONG P.W.; COLLEN D. Fibrinolysis for acute myocardial infarction, current status and new horizon for pharmacological reperfusion, part 1 **Circulation**,103,p 2862, 2001a.

ARMSTRONG PW COLLEN D Fibrinolysis for acute myocardial infarction, current status and new horizon for pharmacological reperfusion, part 2 **Circulation**, 103,p 2987, 2001b.

BAGGIOLINI M.; DEWALD B.; MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.,** 55,p 97–179. 1994.

BAGGIOLINI M.; DEWALD B.; MOSER B. Human chemokines,an update. **Annu. Rev. Immunol**., 15,p 675–705, 1997.

BASILE, D.P. et al. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.,** 286,p F893-F902, 2004.

BAXTER, G.F. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury, time to move on. **Basic Res. Cardiol.,** 97,p 268-275, 2002.

BEEKHUIZEN, H.; VAN DE GEVEL, J.S. Endothelial cell adhesion molecules in inflammation and posischemic reperfusion injury. **Transplant Proc**., 30,p 4251-4256, 1998.

BELOSJOROW, S. et al. TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,** 284,p H927-930, 2003.

BELPERIO, J.A. et al. CXC chemokines in angiogenesis**. J. Leukoc. Biol**., 68(1),p 1-8, 2000.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature,** Dec 19-26, 420 (6917),p 875-8, 2002.

BERLANGA, J. et al. Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. **Am. J. Pathol.**,161,p 373-9, 2002.

BEUTLER, B. CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF, a primary mediator of the host response. **Ann. Rev. Immunol.**,7,p 625-55, 1989.

BLACK, R.A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature,** 385,p 729-733, 1997.

BOERSMA, E.; MAAS, A.C.; DECKERS, J.W. Early fibrinolytic treatment in acute myocardial infarction, reappraisal of the golden hour. **Lancet,** 348,p 771–775, 1996.

BOLLI, R.; JEROUDI, M.O.; PATEL, B.S. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86, 4695–4699,p 1989.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. 2. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol**., Feb,111(2 Suppl),p S460-75, 2003.

BOTOS, I. et al. Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 93,p 2749-2754, 1996.

BOZIC, C.R. et al. The murine interleukin-8 type B receptor homologue and its ligands. **J. Biol. Chem.,** 269,p 29355–29358, 1994.

BRIONES, M.A.; PHILLIPS, D.J.; RENSHAW, M.A.; HOOPER, W. C. Expression of chemokine by human coronary-artery and umbilical-vein endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. **Coron. Artery Dis**., May,12(3),p 179-86, 2001.

BURG, N.D.; PILLINGER, M.H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin. Immunol.,** 2001 Apr,99(1),p 7-17,2001.

CACALANO, G. et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. **Science** (Wash DC), 265,p 682–685, 1994.

CARDEN, D.L.; KORTHUIS, R.J. Protease inhibition attenuates microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle**. Am. J. Physiol.,** 271,p H1947-52, 1996.

CARDEN, D.L.; GRANGER, D.N. Pathophysiology of Ischemia-reperfusion injury. **J. Pathol.,** 190,P 255-66, 2000.

CARSWELL, E.A. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 72,p 3666–3670, 1975.

CHEN, Q. et al. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. **Nat Immunol**., Dec, 7(12), p1299-308, 2006.

CHEN, Y.F. et al. Effect of leukocyte depletion on endothelial cell activation and transendothelial migration of leukocytes during cardiopulmonary bypass. **Ann. Thorac. Surg**., Aug,78(2),p634-42, discussãop 642-3,2004.

CHEUNG, P.Y. et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. **Circulation,** 101,P 1833-1839, 2000.

CHURG, A. et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-α release. ***Am. J. Respir. Crit. Care Med***., 167,p 1083–1089, 2003.

CHINNAIYAN, A.M. et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.,** 271,p4961–5, 1996.

CLARK-LEWIS, I. et al. Structure-activity relationships of chemokines. **J. Leukocyte Biol.**, 57,p703, 1995.

COLLARD, C.D.; GELMAN, S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. **Anesthesiology,** 94, p1133-1138, 2001.

COLLETTI, L.M. et al. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. **Shock,** 10,P 182-191,1998.

CONWAY, J.G. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF-alpha-converting enzyme and matrix metalloproteinases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** Sep;298(3),p900-8, 2001.

DAEMEN, M.A.; VAN DE VEN, M.W.; HEINEMAN, E.; BUURMAN, W.A. Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in renal ischemia/reperfusion injury. **Transplantation,** 67,p792– 800, 1999.

DAWSON, J.; MILTZ, W.; MIR, A.K.; WIESSNER, C. Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. **Expert Opin. Ther. Targets**., Feb, 7(1),p 35-48, 2003.

DELCLAUX, C. et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. **Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol**., Mar, 14 (3), p288-95, 1996.

DEMPSEY, P.W. et al. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Ver**., 14,p 193–209,2003.

DEVALARAJA, R. et al. Delayed wound healing in CXCR2 knock-out mice. **J Invest Dermatol** 115, p234–244, 2000.

DIEKMANN, O.; TSCHESCHE, H. Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** 27, p1865– 76, 1994.

DIENER, A.M.; BEATTY, P.G.; OCHS, H.D.; HARLAN, J.M. The role of neutrophil membrane glycoprotein 150 (Gp-150) in neutrophil-mediated endothelial cell injury in vitro. **J. Immunol**., Jul,135(1),p537-43, 1985.

ENGLISH, W.R. et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-α convertase activity but does not activate pro-MMP2. **J. Biol. Chem***.,* **275**, p 14046–14055, 2000.

FALO, M.C.; FILLMORE, H.L.; REEVES, T.M.; PHILLIPS, L.L. Matrix metalloproteinase-3 expression profile differentiates adaptive and maladaptive synaptic plasticity induced by traumatic brain injury. **J. Neurosci. Res**., Sep, 84(4),p768-81,2006.

FERNANDEZ-RESA, P.; MIRA, E.; QUESADA, A.R. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. **Anal. Biochem.,** Jan 1,224(1),p 434-5,1995.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**., Nov,5(14),p1317-27, 2003.

FOWLKES, J.L.; ENGHILD, J.J.; SUZUKI, K.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. **J. Biol. Chem**., 269, p25742– 6, 1994.

FOXMAN, E.F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis **J. Cell Biol.,** 139,p 1349-62, 1997.

FRANGOGIANNIS, N. G.; et al. 2000. IL-10 induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury**. J. Imunol.,** 165, p 2798-2808, 2000.

FU, Y. et al. Time to treatment influences the impact of ST-segment resolution on one-year prognosis, insights from the assessment of the safety and efficacy of a new thrombolytic (ASSENT-2) trial. **Circulation.** 27, 104(22),p 2653-9, 2001.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Int. Care Med.,** 21(3),p 277-85, 1995.

GALIUTO, L. et al. Temporal evolution and functional outcome of no reflow, sustained and spontaneously reversible patterns following successful coronary recanalisation **Heart,** 89,p 731–737, 2003.

GARTON, K.J. et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). **J. Biol. Chem.,** Oct 12;276 (41), p37993-8001, 2001.

GARTON, K.J. et al. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). **J. Biol. Chem**.,Sep 26,278(39),p37459-64, 2003.

GELATIN ZYMOGRAPHY. Disponível em: <http: www.bris.ac.uk/bhi/mark/zymo.html> Acesso em 06 fev. 2007

GERARD, C. et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J. Exp. Med.,** 177,p 547, 1993.

GILLES, S. et al. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. **Cardiovasc. Res.,** 60,P 608-616, 2003.

GILMONT, R.R. et al. TNF-alpha potentiates oxidant and reperfusion-induced endothelial cell injury. **J. Surg. Res.,** 61, p175-182, 1996.

GISSI-1: Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI).**Lancet,** Feb 22, 1(8478), p397-402, 1986.

GISSI-2: a factorial randomised trial of alteplase versus streptokinase and heparin versus no heparin among 12,490 patients with acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico **Lancet,** Jul 14, 336(8707),p 65-71, 1990

GOTO, T. et al. Importance of tumor necrosis factor-alpha cleavage process in post-transplantation lung injury in rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 170,p 1239-1246, 2004.

GRANGER, D.N.; HOLLWARTH, M.E.; PARKS, D.A. Ischemiareperfusion injury, role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiol Scand** Suppl 548, p47-63, 1986.

GRANGER, D.N. Ischemia-reperfusion, mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. **Microcirculation**, Sep,6(3),p167-78, 1999.

GRANGER, D.N. et al. Splanchnic Ischemia-reperfusion injury, mechanistic insights provided by mutant mice. **Acta Physiol. Scand.,** 173, p83-91, 2001.

GRUBE, E. et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. **Circulation**, 107, p38-42, 2003.

HAGEMANN, T. et al. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. **Carcinogenesis,** Aug, 25(8),p1543-9, 2004.

HARLAN, J.M. et al. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment. **J. Clin. Invest**.,Dec;68(6),p1394-403, 1981.

HARO, H. et al. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-α in a model of herniated disc resorption. **J. Clin. Invest**., 105, p143–150, 2000.

HASHIMOTO, K.; PEARSON, P.J.; SCHAFF, H.V.; CARTIER, R. Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion, a possible mechanism of myocardial injury during reflow. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.,** Nov,102(5),p688-94, 1991.

HE, C.S. et al. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 86, p2632– 6, 1989.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, May, 115(1), p1-20, 2005.

HELARY, C et al.Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. **Biomaterials**, Sep,v 27(25),p4443-52. 2006

HOLMES, W.E. et al. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. **Science,** 253,p1278–1280, 1991.

HOUAISS, A.; SALLES, V.M. **Dicionário Houaiss de língua portuguesa**. Rio de janeiro, Objetiva, 2001 Vários verbetes.

HSU, H. et al. TNFdependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. **Immunity**, 4, p387–96, 1996.

HURTADO, O. et al. Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. **Neuropharmacology**, v. 40, p.1094-1102, 2001

ISIS-1:Randomised trial of intravenous atenolol among 16 027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1. First International Study of Infarct Survival Collaborative Group. **Lancet.** Jul 12, 2(8498),p 57-66, 1986.

ITO, A. et al. Degradation of interleukin 1β by matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.,** 271, p 14657–14660, 1996.

JANSSENS, S.; LIJNEN, H.R. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? **Cardiovasc. Res.,** Feb 15,69(3),p 585-94, 2006.

JOHNSON, Z. et al. Chemokine inhibition--why, when, where, which and how? **Biochem. Soc.Trans.,** 32(Pt 2),p 366-77, 2004.

JORDAN, J.E.; ZHAO, Z.Q.; VINTEN-JOHANSEN, J. 1999. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.,** 43, p 860-878, 1999.

JOYCE, D.A.; STEER, J.H. IL-4, IL-10 and IFN-gamma have distinct, but interacting, effects on differentiation-induced changes in TNF-alpha and TNF receptor release by cultured human monocytes**. Cytokine,** Jan, 8(1),p 49-57, 1996.

KATANCIK, J.A.; SHARMA, A.; DE NARDIN, E. Interleukin 8, neutrophilactivating peptide-2 and GRO-alpha bind to and elicit cell activation via specific and different amino acid residues of CXCR2**. Cytokine** 12, p 1480– 1488, 2000.

KECK, T. et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. **Gastroenterology,** 122, p 188-201, 2002.

KERMARREC, N. et al. Regulation of peritoneal and systemic neutrophil-derived tumor necrosis factor-alpha release in patients with severe peritonitis, role of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme cleavage. **Crit. Care Med**., Jun, 33(6),p 1359-64, 2005.

KHANDOGA, A. et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liverJ **Leukoc. Biol.**, Jun, 79(6), p 1295-305, 2006.

KISCHKEL, F.C. et al. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. **Immunity,** 12, p 611–20, 2000.

KLEINER, D.E.; STETLER-STEVENSON, W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal. Biochem.,** May 1, 218(2), p 325-9, 1994.

KLOMPJE, J. Prevention of bowel ischaemia following surgery to the abdominal aorta, a review **J. R. Soc. Med.,** 80,p 574-575, 1987.

KLONER, R.A.; PRZYKLENK, K.; CAMPBELL, C.A. Coronary reperfusion following experimental myocardial infarction. **J. Card. Surg.**, 2,p 291–297, 1987.

KOHTANI, T. et al. Protective effects of anti-neutrophil antibody against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Eur. Surg. Res.,**34,p 313-320, 2002.

KORTHUIS, R.J.; GUTE, D.C. Postischemic leukocyte/endothelial cell interactions and microvascular barrier dysfunction in skeletal muscle, cellular mechanisms and effect of Daflon 500 mg. Int J **Microcirc. Clin. Exp.,**17, Suppl 1,p11-7, 1997.

KRIDEL, S.J. et al. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. **J. Biol. Chem.,** 276,p 20572–8, 2001.

KURIHARA, T.; WARR, G.; LOY, J.; BRAVO, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. **J. Exp. Med.,** 186, p1757–1762, 1997.

KUZIEL, W.A. et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94,p 12053–12058, 1997.

LANE, J.S. et al. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. **Surgery,** Aug, 122(2),p 288-94, 1997.

LEE, J. et al. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor**. J. Immunol.,** 155,p 2158– 2164, 1995.

LEE, J. et al. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. **J. Biol. Chem**., 267,p 16283-16287, 1992.

LEEUWENBERG, J.F.; JEUNHOMME, T.M.; BUURMAN, W.A. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes in vitro. **J. Immunol.**, Apr 15, 152(8),p 4036-43, 1994.

LEFER, A.M.; LEFER, D.J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion**. Cardiovasc. Res**., Oct, 32(4), p743-51, 1996.

LEHRER, R.I. et al. Neutrophils and host defense. **Ann. Intern. Med.,** Jul 15, 109(2),p127-42, 1988.

LEPPER, W. et al. Assessment of myocardial reperfusion by intravenous myocardial contrast echocardiography and coronary flow reserve after primary percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. **Circulation,** 101,p 2368–74, 2000.

LI, Q.; PARK, P. W.; WILSON, C. L.; PARKS, W. C. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. **Cell**, 111,p 635–646, 2002.

LI, X. Y.; DONALDSON, K.; BROWN, D.; MACNEE, W. The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.,** 13, p185–195, 1995.

LOCATI, M. et al. The chemokine system, tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses**. Allergy**, Nov, 57(11),p 972-82, 2002.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation, present and future therapeutic targets. **Nat. Immunol.,** Dec, 6(12), p1182-90, 2005.

LUSTER, A.D. Chemokines, chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 338,p 436–445, 1998.

LUTHER, S.A.; CYSTER, J.G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. **Nat. Immunol.,** Feb, 2(2), p102-7, 2001.

MACDERMOTT, R.P. Chemokines in the inflammatory bowel diseases**. J. Clin. Immunol.**, Sep, 19(5), p266-72, 1999.

MACFIE, J. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years **Br. J. Surg.,** 93,p 87–93, 2006.

MAGNONI, S. et al. Differential alterations in the expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 after transient cerebral ischemia in mice. **Neurobiol. Dis.,** 17,p 188-197, 2004.

MARCHANT, A. et al. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. **Eur .J. Immunol.,** 24, p1167, 1994.

MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/ reperfusion injury. **Transplant Proc**., 30,p4217-23, 1998.

MATOS, I.M. et al. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. **Eur. J. Pharmacol**., 376, p293-300, 1999.

MATSUMOTO, R., MATSUMOTO, H., SEKI, M., HATA, M., ASANO, Y., KANEGASAKI, S., STEVENS, R.L., HIRASHIMA, M. (1998) Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. **J. Biol. Chem**. (27),p16976-16984, 1998.

MCQUIBBAN, G.A. et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. **J. Biol. Chem.,** 276,p 43503–43508, 2001.

MCQUIBBAN, G.A. et al. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. **Blood,** 100,p 1160–1167, 2002.

MEIGHAN, S.E. et al. Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity**. J. Neurochem.,** Mar, 96(5), p1227-41, 2006.

MERCHANT, S.H.; GURULE, D.M.; LARSON, R.S. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptid blockade of ICAM-1. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,** 284, pH1260-H1268, 2003.

MEZYK, R.; BZOWSKA, M.; BERETA, J. Structure and functions of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **Acta Biochim. Pol**., 50(3), p625-45, 2003.

MICHELE, D.E.; CAMPBELL, K. Dystrophin–glycoprotein complex, post-translational processing and dystroglycan function. **J. Biol. Chem.,** 278, p15457-15460, 2003.

MIRANTI, C.K.; BRUGGE, J.S. Sensing the environment, a historical perspective on integrin signal transduction. **Nat. Cell Biol.,** 4,p 83-90, 2002.

MOHAN, M.J. et al. The tumor necrosis factor-α converting enzyme (TACE), a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. **Biochem.,** 41, p9462–9469, 2002.

MOORE, E.E. et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure**. J. Trauma,** *37*, p881-887, 1994.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor **Annu Rev Immunol**., 19, p683-765, 2001.

MOSS, M.L.; WHITE, J.M.; LAMBERT, M.H.; ANDREWS, R.C. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discov. Today,** 6, p417-426, 2001.

MOTT, J.D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.,** Oct, 16(5), p558-64, 2004.

MUELLER, C. et al. Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) mediates effects distinct from those of wild-type TNFalpha in vitro and in vivo**. J. Biol. Chem.,** 274,p 38112-38118, 1999.

MURPHY, P.M.; TIFFANY, H.L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor**. Science,** 253, p1280–1283, 1991.

NAGAOKA, I.; HIROTA, S. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. **Inflamm. Res.,** 49, p55– 62, 2000.

NEWTON, R.C. et al. Biology of TACE inhibition. **Ann. Rheum. Dis.,** Nov, 60 Suppl 3,piii25-32, 2001.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils, importance of localized pathways **Intl. J. Biochem. Cell Biol.,** 35,p1619–1638, 2003.

ODAKE, S. et al. Inhibition of matrix metalloproteinases by peptidyl hydroxamic acids**. Biochem. Biophys. Res. Commun.,** Mar 30, 199(3),p1442-6, 1994.

OHMORI, Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. **Am. J. Pathol.,** 142,p 861, 1993.

OPDENAKKER, G.; VAN DAMME, J. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. **Immunol. Today,** 13,p 463–464, 1992.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; VAN DAMME, J. Gelatinase B, a tuner and amplifier of immune functions. **Trends Immunol.,** 22, p571–579, 2001.

ORTEGA, N.; WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **J. Cell Sci. ,** 115,p4201-4214, 2002.

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.,** Aug, 4(8),p617-29, 2004.

PEREZ, C. et al. Fever in immunocompromised patients. **N. Engl. J. Med.,** 341, p893, 1999.

PEREZ, C. et al. Nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. **Cell,** Oct 19, 63(2),p 251-8. 1990.

PESCHON, J.J. et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science,** Nov 13, 282 (5392),p1281-4, 1998.

PORTEU, F.; NATHAN, C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. **J. Exp. Med.,** 172**,** 599–607, 1990.

PRESTON, A. Matrix Metalloproteinases (MMPs), Extracellular Matrix Proteases & Proteins Technical Guide Disponível em, < www.emdbiosciences.com/docs/docs/LIT/CB0707.pdf > Acesso em, 27 jan. 2007.

PROUDFOOT, A.E. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions**. Biochem Soc Trans.** Jun,v34(Pt 3),p422-6, 2006.

REDDY, P. et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **J. Biol. Chem**., May 12, 275(19), p14608-14, 2000.

ROLLINS, BJ. Chemokines. **Blood,** 90,909–928, 1997.
ROMANIC, A.M. et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. **Cardiovasc. Res.,** 54,p 549-558, 2002.

ROMSON, J.L. et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog.**Circulation,** May, 67(5),p1016-23, 1983.

ROSARIO, H.S.; WALDO, S.W.; BECKER, S.A.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat**. Am. J. Pathol.,** 164, p1707-1716, 2004.

RUTSCHOW, S.; LI, J.; SCHULTHEISS, H.P.; PAUSCHINGER, M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. **Cardiovasc. Res**., Feb 15, 69(3),p646-56, 2006.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Curr. Opin. Immunol.,** Dec, 16(6),p724-31, 2004.

SATRIANO, J.A. et al.Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. **J. Immunol.,** 150,p 1971, 1993.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. **Trends Cell. Biol**., Jul, 13(7),p366-75, 2003.

SCHOFER, J. et al. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS). **Lancet**, 362(9390), p1093-9, 2003.

SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1β by matrix metalloproteinases, a novel caspase-1-independent pathway of IL-1β processing. **J. Immunol***.,* 161, p3340–3346, 1998.

SEXTON, D.W; WALSH, G.M. Eosinophil-epithelial cell interactions, an important facet of asthmatic inflammation. **Clin. Exp. Allergy,** Jun, 32(6), p811-3, 2002.

SHEN, B. et al.Induction of matrix metalloproteinase-2 and -3 activity in ovine nucleus pulposus cells grown in three-dimensional agarose gel culture by interleukin-1beta: a potential pathway of disc degeneration. **Eur Spine J**., Feb,v 12(1),p.66-75, 2003.

SHIGEMATSU, T.; WOLF, R.E.; GRANGER, D.N. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion **Microcirculation.**, Apr; 9(2), p 99-109, 2002.

SISLEY, A.C.; DESAI, T.; HARIG, J.M.; GEWERTZ, B.L. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. **J. Surg. Res**., Jul, 57(1),p192-6, 1994.

SOCCAL, P.M. et al. Matrix metalloproteinase inhibition decreases ischemia-reperfusion injury after lung transplantation**. Am. J. Transplant,** 4, p41-50, 2004.

SOOND, S.M.; EVERSON, B.; RICHES, D.W.; MURPHY, G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. **J. Cell Sci**., Jun 1, 118(Pt 11),p 2371-80, 2005.

SOUZA, D.G. et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 131(8),p1800-8, 2000a.

SOUZA, D.G. et al. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.,** 403(1-2),p121-8, 2000b.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury.**Br. J. Pharmacol.,** 134(5), p985-94, 2001.

SOUZA, D.G. et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am. J. Pathol.,** 160, p1755-1765, 2002.

SOUZA, D.G. et al. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **J. Immunol.,** 170,p 4759-4766, 2003a.

SOUZA, D.G. et al. Role of the bradykinin B2 receptor for the local and systemic inflammatory response that follows severe reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.,** 139,p 129-139, 2003b.

SOUZA, D.G. et al. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. **Br. J. Pharmacol.,** 139, p733-740, 2003c.

SOUZA, D.G. et al. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal Ischemia and reperfusion injury**. Br. J. Pharmacol.,** 143, p132-142, 2004a.

SOUZA, D.G. et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. **J. Immunol.,** 172, p2542-2548, 2004b.

SOUZA, D.G.**Papel das citocinas TNF-α e IL-10 em lesões associadas com isquemia e reperfusão intestinal**. 2004c (Doutorado em Farmacologia) Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

SOUZA, D.G. et al. APT070 (Mirococept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal Ischemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.,** 145,p 1027-1034, 2005a.

SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M., 2005b. The balance between the production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** 100, p59-66, 2005b.

SOUZA, D.G. et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J. Immunol.,** 173,p 4137-4146, 2005c.

SOUZA, M. S. L. **Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses.** 3 ed. rev.aum. Belo Horizonte, Coopmed, 2005.

STALLION, A. et al. Ischemia/reperfusion, a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. **J. Pediatr. Surg.,** Mar, 40(3), p470-7 , 2005.

STANGER, B.Z. et al. RIP. a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. **Cell,** 81,p 513–23, 1995.

STEINKE, J.W.; BORISH, L. 3. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.,** Feb, 117(2 Suppl Mini-Primer), pS441-5, 2006.
STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,** 17, p463-516, 2001.

SWANK, G.M.; DEITCH, E.A. Role of the gut in multiple organ failure, bacterial translocation and permeability changes. **World J. Surg.,** May, 20(4), p411-7, 1996.

TAO, Z.Y. et al. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. **Life Sci.,** 74,p 1561– 72, 2004.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunol. Today,** May, 13(5), p151-3, 1992.

TARZAMI, S.T. et al. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury, recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. **Circulation,** Nov 11, 108(19), p2387-92, 2003.

TRIFILIEFF, A. et al. Pharmacological profile of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF-alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases, in models of airway inflammation. **Br. J. Pharmacol.,** 135, p1655-1664, 2002.

TSAKADZE, N.L. et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). **J. Biol. Chem**., Feb 10, 281(6),p 3157-64, 2006.

TSUNODA, I.; LANE, T.E.; BLACKETT, J.; FUJINAMI, R.S. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis, implication of differing roles for IP-10. **Mult. Scler.,** Feb, 10(1),p 26-34, 2004.

VAN DEN STEEN, P. E. et al.Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-α and leaves RANTES and MCP-2 intact. **Blood,** 96, p2673–2681, 2000.

VAN ZEE, K. J. et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 89, p4845–4849, 1992.

VERMA, S. et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist**. Circulation,** 105, p2332-36, 2002.
VERMEIREN, G.L. et al. Reperfusion injury after focal myocardial ischaemia, polymorphonuclear leukocyte activation and its clinical implications. **Resuscitation.** Jun, 45(1),p 35-61, 2000.

VIAPPIANI, S.; SARIAHMETOGLU, M.; SCHULZ, R. The role of matrix metalloproteinase inhibitors in ischemia-reperfusion injury in the liver. **Curr. Pharm. Des.,**12(23), p2923-34, 2006.

VILČEK, J.; FELDMANN, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. **Trends Pharmacol. Sci.,** Apr., 25(4), p201-9, 2004.

VULCANO, M. et al. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. **Eur. J. Immunol.,** Mar,31(3), p812-22, 2001.

WAETZIG, G.H. et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. **FASEB J**., Jan, 19(1),p 91-3, 2005.

WALSH, G.M. Targeting airway inflammation, novel therapies for the treatment of asthma. **Curr. Med. Chem.,** 13(25), p3105-11, 2006.

WANG, Q.D.; PERNOW, J.; SJOQUIST, P.O.; RYDEN, L. Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.,** Jul, 55(1),p 25-37, 2002.

WANG, X. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by a selective antagonist protects brain from focal ischemic injury in rats. **Mol. Pharmacol.,** 65,p 890-896, 2004.

WEBER-NORDT, R.M. et al. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood,** 88, p2549, 1996.

WEIGHT, S.C.; BELL, P.R.; NICHOLSON, M.L. Renal ischaemiareperfusion injury. **Br. J. Surg.,** 83, p162-170, 1996.

WEIL, M.H.; BECKER, L.B.; BUNDINGER, T. Worshop executive summary report, post-resuscitative and initial utility in life saving efforts (PULSE). **Circulation,** 103, p1182-1184, 2001.

WELBORN, M.B. 3rd et al. Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. **Shock,** 6, p171-176, 1996.

WHO. Cardiovascular disease, prevention and control. Disponível em, <http,//www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/> Acesso em, 08 fev. 2007

WINN, R.J. The role of oncology clinical practice guidelines in the managed care era. **Oncology** (Williston Park), Nov, 9(11 Suppl), p177-83, 1995.

XIAO, Y.Q. et al. Possible participation of macrophage inflammatory protein 2 in neutrophil infiltration in allergic inflammation in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Aug 22, 1361(2), p138-46, 1997.

XIE, H. ; LIM, Y.C.; LUSCINSKAS, F.W. ; LICHTMAN, A.H. Acquisition of selectin binding and peripheral homing properties by CD4+ and CD8+ T cells**. J. Exp. Med.,** 189, p1765–1776, 1999.

YAGIHASHI, A. et al. Prevention of small intestinal ischemia-reperfusion injury in rat by anti-cytokine-induced neutrophil chemoattractant monoclonal antibody. **J. Surg. Res.,** 78, p92-96, 1998.

YAMAMOTO, S. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. **J. Surg. Res.,** 99, p134-141, 2001.

YANG, Y. et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.,** Jul 19, 2006 [Epub ahead of print]

YONEDA, A.; COUCHMAN, J.R. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. **Matrix Biol.,** 22, p25-33, 2003.

YOUN, B.S.; MANTEL, C.; BROXMEYER, H.E. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. **Immunol. Rev**., 177,p150-74, 2000.

ZHANG, M. et al., Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**., Mar 16, 101(11),p 3886-91, 2004.

ZHANG, Y. et al. Identification and characterization of 4-[[4-(2-butynyloxy)phenyl]sulfonyl]-N-hydroxy-2,2- dimethyl -(3S) thiomorpholinecarboxamide (TMI - 1) , a novel dual tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/matrix metalloprotease inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** Apr, 309(1), p348-55, 2004.

ZINGARELLI, B. et al. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. **Gut,** 48, p610-622, 2001.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines, a new classification system and their role in immunity. **Immunity.** Feb, 12 (2) , p121 – 7, 2000 .

ZWEIER, J.L.; FLAHERTY, J.T.; WEISFELDT, M.L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of schemic myocardium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 84, p1404-1407, 1987.