

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DAVID VALTER PEREIRA

**EFEITOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA (GRPR) RC-3095 EM ANIMAL MODELO
DE UVEÍTE**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DAVID VALTER PEREIRA

**EFEITOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA (GRPR) RC-3095 EM ANIMAL MODELO
DE UVEÍTE**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436e Pereira, David Valter.

Efeitos do antagonista do receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRPR) RC-3095 em animal modelo de uveíte / David Valter Pereira; orientador: Felipe Dal-Pizzol. – Criciúma : Ed. do autor, 2008.

55 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2008.

1. Uveíte. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Dexametasona. 4. Receptores da bombesina. I. Título.

CDD. 21^a ed. 617.72



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

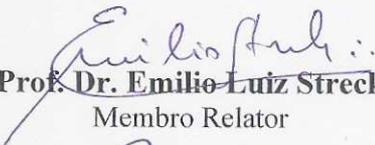
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a argüição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **DAVID VALTER PEREIRA** sob o título “Efeitos do Antagonista Receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRP) RC-3095 em animais modelo de uveíte” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 08 de dezembro de 2008.


Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Membro Relator


Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Membro Externo


Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Membro Interno

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Orientador


Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Coordenador do PPGCS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Felipe meu Irmão e Orientador, que de maneira objetiva e inteligente resolveu todos os meus problemas.

Ao Emílio meu Irmão, que me deu a única nota baixa em todo o mestrado, mostrando a seriedade do programa.

Ao Bruno meu colega de turma que me aproximou de todos os demais colegas e estava ao meu lado nas horas mais difíceis (festas e etc..) E aiii Bruno!!!!

Aos professores, funcionários e alunos do PPGCS pelos ensinamentos que vou carregar por toda a minha vida.

A todos os estagiários, em especial a Amanda, que foi de fundamental importância nos nossos experimentos.

A Fabricia minha colega, que não poupou esforços para o desenvolvimento de nossos experimentos.

A UNESCO que permitiu todo o nosso desenvolvimento intelectual.

A minha família, em especial a minha esposa Hilda e meus filhos Valter e Maria Olívia.

RESUMO

Vários estudos têm mostrado o papel do peptídeo liberador de gastrina (GRP) sobre a produção e liberação de citocinas tanto em modelos animais quanto em humanos com doenças inflamatórias, mas não existe nenhum relato sobre os efeitos do peptídeo liberador de gastrina em uveíte. Nós relatamos os efeitos do antagonista de receptor de GRP (GRPR), RC-3095, em um modelo bem estabelecido para uveíte induzido pela administração de lipopolissacarídeos (LPS), comparando seus efeitos aos dos glicocorticóides. Ratos adultos machos Wistar (pesando 250-300g, n = 6 por grupo) foram divididos em quatro grupos: (1) salina (2) LPS + salina (3) LPS + dexametasona (4) LPS + RC-3095. Duas horas após a administração do LPS, RC-3095 (0.3mg/kg, dose única, por via subcutânea) ou dexametasona (1mg/kg, cada 6 horas, por via subcutânea) foram administrados. Após 24 e 48h os ratos foram anestesiados e amostras do humor aquoso foram aspiradas bilateralmente com uma agulha 30-G e a íris foram removidas sob a visualização de um microscópio. A concentração de TNF- α e a atividade da mieloperoxidase (MPO) foram determinadas no humor aquoso. Além disso, danos oxidativos na íris foram determinados pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonil. A pronta administração do RC-3095 exibiu acentuada ação antiinflamatória, caracterizada por uma marcada redução da atividade da mieloperoxidase e uma diminuição nos níveis de TNF- α . Além disso, RC-3095 revela uma importante ação contra danos oxidativos na íris. Estes achados sugerem que o GRP participa na resposta inflamatória em um modelo animal de uveíte, sendo o GRPR um alvo para novas opções terapêuticas no tratamento de uveíte.

Palavras-chave: uveíte; lipopolissacarídeo; dexametasona; receptores de peptídeo liberador de gastrina; RC-3095; dano oxidativo.

ABSTRACT

Several studies have shown the role of gastrin-releasing peptide (GRP) on the production and release of cytokines both in animal models and humans with inflammatory diseases, but there is no report on the effects of GRP in uveitis. We report on the effects of the GRP receptor (GRPR) antagonist, RC-3095, in a well-established model for uveitis induced by the administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids. Adult male Wistar rats (weighing 250-300g, n=6 per group) were randomly divided into four groups: (1) saline (2) LPS + saline (3) LPS + dexamethasone (4) LPS + RC-3095. Two hours after LPS administration, RC-3095 (0.3mg/kg, single dose, subcutaneously) or dexamethasone (1mg/kg, each 6 hours, subcutaneously) were administered. After 24 and 48h rats were anesthetized and aqueous humor was sampled bilaterally by aspirating with a 30-G needle under microscope visualization, and the irides were removed. Aqueous humor TNF- α concentration and myeloperoxidase (MPO) activity were determined. In addition, oxidative damage to the irides was determined by the measure of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl content. The acute administration the RC-3095 exhibited pronounced anti-inflammatory actions, characterized by a marked reduction of myeloperoxidase activity and a decrease on TNF α levels. In addition, RC-3095 elicit important action against irides oxidative damage. These findings suggest that GRP participate in the inflammatory response in an animal model of uveitis, being the GRPR a target to new therapeutic options in the treatment of uveitis.

Keywords: uveitis; lipopolysaccharide; dexamethasone; Gastrin-releasing peptide receptor; RC-3095; Oxidative damage.

SUMÁRIO

Resumo.....	4
Abstract.....	5
1 Introdução.....	7
1.1. Resposta inflamatória - mecanismos gerais.....	7
1.2. Resposta inflamatória nas uveítes.....	9
1.3. Resposta ao LPS - Implicações para o modelo de uveíte.....	10
1.4. Novos mediadores inflamatórios - caso do peptídeo liberador de gastrina.....	12
1.5. RC-3095.....	16
2 Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3 Artigo.....	18
4 Discussão.....	38
5 Referências.....	43

1.INTRODUÇÃO

O termo uveíte indica inflamação da coróide (coroidite), do corpo ciliar (uveíte intermediária, ciclite, uveíte periférica, ou pars planite), ou da Iris (irite), podendo estar associada a condições inflamatórias auto-imunes ou infecciosas (Michel & Foster, 2002; Vaughan et al., 2003). A uveíte geralmente afeta pessoas entre 20-50 anos de idade e corresponde a cerca de 10-15% dos casos de cegueira nos países desenvolvidos (Vaughan et al., 2003).

A uveíte constitui importante causa de cegueira em todo mundo. Sua incidência é reportada nos Estados Unidos numa faixa que varia de 17 a 24 por 100.000 habitantes por ano, e sua prevalência de 38 a 204 por 100.000 habitantes por ano. Estudos epidemiológicos podem refletir diferentes padrões de etiologia das uveítes, no entanto eles podem mostrar características particulares de cada centro (terciário, critério de diagnóstico, interesses específicos) (Fernandes et al., 2000). Em nosso meio, uveíte é o principal diagnóstico encontrado em indivíduos que freqüentam instituições para reabilitação visual e é responsável por 4% dos atendimentos em serviços de urgência. Sua incidência varia de 14 a 28 em 100.000 habitantes (Gouveia et al., 2004).

1.1 - Resposta inflamatória – Mecanismos gerais

As células do sistema imune estão amplamente distribuídas pelo organismo, mas quando se instala um processo infeccioso, há a necessidade de concentrar estas células e seus produtos no local da infecção. Este processo se manifesta como uma inflamação e compreende três eventos principais:

- Aumento do suprimento sangüíneo para a área afetada,

- Aumento da permeabilidade capilar ocasionado pela retração das células endoteliais, como conseqüente escape de moléculas maiores permitindo, então, que os mediadores solúveis da imunidade atinjam o local da infecção.
- Migração dos leucócitos, dos capilares para os tecidos circundantes. Na fase final da inflamação, os neutrófilos são particularmente prevalentes, mas tardiamente no processo, os monócitos e linfócitos também migram para o local inflamado (Roitt et al., 2003).

O processo de migração celular é controlado por quimiocinas na superfície do endotélio das vênulas nos tecidos inflamados. As quimiocinas ativam as células circundantes promovendo sua ligação ao endotélio e iniciando a migração dos leucócitos através do endotélio. Uma vez nos tecidos, as células migram em direção do local da infecção através de um evento de atração química conhecido como quimiotaxia. Por exemplo, os fagócitos migram ativamente mediante gradientes de concentração de determinadas moléculas (quimiotáticas). Um dos componentes do complemento, o fragmento C5a, é particularmente ativo, exercendo atração sobre neutrófilos e monócitos. Quando o C5a purificado é aplicado *in vivo* à base de uma lesão, em pouco tempo observa-se a adesão dos neutrófilos aos capilares vizinhos. Os neutrófilos atingem os tecidos passando por entre as células endoteliais e abrindo a membrana basal dos microvasos, num processo de diapedese (Roitt et al., 2003).

A maioria dos sistemas biológicos requer uma interação celular para seu desenvolvimento e regulação, incluindo o sistema imune. A comunicação entre as células imune geralmente envolve uma variedade de citocinas que são induzidas por um largo espectro de estímulos e secretados por muitos tipos celulares, Estes

mediadores são particularmente importantes na promoção da proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas e na regulação e determinação da natureza da resposta imune. Além disso, elas participam em vários processos inflamatórios. Cada citocina exerce um número de efeitos em diversos alvos celulares diferentes, e sua ação pode ser modulada pela presença de outras citocinas. (interação entre as citocinas pode ser sinérgica ou inibitória), contudo cada citocina pode induzir ou inibir a produção de outras. Estas observações levam ao conceito de uma rede de citocinas que controlam o processo fisiológico da imunidade (Theze, 1999).

1.2 – Resposta inflamatória nas uveítes

Recente estudo em modelo animal de uveíte mostrou que as quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES são expressas em diferentes regiões do globo ocular durante o processo inflamatório (Crane et al., 2001). Estas características parecem ocorrer também em seres humanos. A quimiocina na CXCL8/IL-8, que é capaz de induzir a migração e ativação dos neutrófilos e a sua interação com células endoteliais vasculares, tem sido encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com doença de Behçet (Wang et al., 1997; Mantas et al., 2000). Em estudo envolvendo pacientes com uveíte anterior idiopática, se encontram níveis elevados de CXCL8/IL-8 em humor aquoso em 50% das amostras de pacientes com uveíte em atividade, enquanto que em pacientes na forma quiescente da doença não foram encontradas alterações desta quimiocina (Verma et al., 1997).

As citocinas pró inflamatórias interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-6, interferon- γ e fator de necrose tumoral- α foram todos detectados dentro dos fluidos ou tecidos oculares do olho inflamado juntamente a IL-4, IL-5, IL-10 e fator de transformação de crescimento- β . As quimiocinas IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α , MIP-1 β e fractalcina parecem estar envolvidos na resposta inflamatória (Kenneth et al., 2006).

TNF- α é sintetizada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células natural killer (NK) e células T (Tracey, 1997). Durante o processo inflamatório, é orquestrado a futura infiltração leucocitária via molécula de adesão, maturação e sobrevivência de células dendríticas, ativação de macrófagos, e direcionamento Th1 nas respostas das células T dentro dos tecidos na uveíte experimental (Dick et al., 2004). Foi visto uma expressão aumentada de TNF- α em infiltrados de células inflamatórias próximo ao pico inflamatório de uveíte experimental (Okada et al., 1998). Aumento de TNF- α mRNA foi detectado no corpo ciliar e íris no pico da doença uveíte anterior experimental (de Kozak & Verwaerde, 2002).

1.3 - Resposta ao LPS – Implicações para o modelo de uveíte

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS ou endotoxina) é um produto de bactérias Gram-negativas e um potente estimulador das respostas imunes inatas que acentua a morte das bactérias, mas ele pode também causar alterações patológicas significativas no hospedeiro. O LPS é uma mistura de fragmentos das paredes celulares externas das bactérias Gram-negativas e contém tanto componentes lipídicos quanto porções polissacarídicas. Os grupos polissacarídicos podem ser altamente variáveis e são os principais antígenos das bactérias Gram-

negativas reconhecidos pelo sistema imune adaptativo. A porção lipídica, em contraste, é altamente preservada e é um exemplo de um padrão molecular reconhecido pelo sistema imune inato. (Abbas & Lichtman, 2005).

As duas proteínas humorais importantes que reconhecem o LPS são a **proteína de ligação do LPS (LBP, *LPS-binding protein*)** e a **CD14 solúvel**. Cada uma dessas proteínas pode formar complexo com o LPS existente na superfície bacteriana, e, por sua vez, esses complexos são eficientemente reconhecidos por receptores de superfície especializados presentes nas células endoteliais, neutrófilos, monócitos e muitos outros tipos celulares humanos (Parslow et al., 2004). Ao mesmo tempo, a interação desses complexos de LPS com pelo menos uma classe de receptores denominados receptores semelhantes ao Toll, transmite sinais no interior da célula que pode levar a grandes alterações fisiológicas no hospedeiro. Os receptores semelhantes ao TOLL (TLRs) são uma família de proteínas de membrana que servem como receptores de reconhecimento de padrão para uma variedade de moléculas derivadas de microorganismos e estimulam as respostas imunes inatas aos microorganismos expressando estas moléculas. Os TLRs são expressos em muitos tipos celulares diferentes que são componentes do sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais mucosas e células endoteliais. A via de sinalização predominante usada pelos TLRs resulta na ativação do NF- κ B. Nessa via, a ligação do ligante ao TLR na superfície de célula leva ao recrutamento de várias moléculas de sinalização citoplasmáticas, mediante interações específicas domínio-domínio. A primeira proteína a ser recrutada é a proteína adaptadora citoplasmática MyD88, a qual contém um domínio TIR que provavelmente se liga ao domínio TIR do TLR. A MyD88 também contém um domínio de morte, homólogo ao encontrado nas

moléculas de sinalização da família de receptores TNF. Uma segunda proteína a ser recrutada dentro do complexo de sinalização é chamada cinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK). A IRAK contém um domínio de morte que medeia as interações com o domínio de morte da MyD88 e com o domínio serina/treonina da proteína-cinase. Quando ocorre o recrutamento, a IRAK sofre autofosforilação, se dissocia da MyD88 e ativa o fator 6 associado ao TNF-R (TRAF-6). O TRAF-6, então, ativa a cascata da cinase I κ B, levando à ativação de NF- κ B. Os genes que são expressos em respostas à sinalização pelo TLR codificam proteínas importantes em muitos componentes diferentes das respostas imunes inatas. Estas incluem citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-12), moléculas de adesão endotelial (E-selectina) e proteínas envolvidas nos mecanismos de morte microbiana (sintase induzida do óxido nítrico) (Abbas & Lichtman, 2005).

1.4– Novos mediadores inflamatórios – caso do peptídeo liberador de gastrina

A bombesina é um peptídeo isolado por Anastasi et al. a partir da pele de sapo *Bombina bombina* em 1971 (Anastasi et al., 1971). Um análogo mamífero da bombesina, com potente atividade liberadora, o peptídeo liberador de gastrina (GRP), foi caracterizado quimicamente em 1978 a partir do tecido gástrico de suínos (McDonald et al., 1978). Pouco tempo depois um novo análogo da bombesina foi identificado a partir da medula espinhal de suínos foi identificada a neuromedina B (NMB) (Minamino et al., 1983).

GRP e a bombesina partilham de uma seqüência altamente conservada o que é necessário para imunogenicidade e para alta afinidade na ligação ao GRP-receptor (GRPR) (Sunday et al., 1988). Estes receptores são acoplados a proteína G

através dos seus domínios intracelular e, portanto, pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteína G (Helmich et al., 1999; Aprikian et al., 1997). GRP tem um importante papel na regulação da contração do músculo liso, liberação hormonal no trato gastrointestinal, secreção de enzimas pancreáticas e age como um neurotransmissor no sistema nervoso central (CNS) (Bunnett, 1994). Além disso, o GRP é reconhecido como um fator de crescimento para uma variedade de tumores malignos (Cornelio et al., 2007; Zhou et al., 2004; Patel et al., 2006).

Recentemente os efeitos desses peptídeos sobre a produção e a liberação de citocinas foram descritos tanto em modelos animais como em seres humanos com doenças inflamatórias. Algumas patologias, como a exposição ao fumo, doença pulmonar obstrutiva crônica e granuloma eosinofílico, tem encontrado recentemente uma associação com aumento da produção de BLP pelas células pulmonares (Aguayo et al., 1989; Gosney et al., 1989; Aguayo et al., 1990).

As evidências para o envolvimento dos neuropeptídios nas doenças inflamatórias tem se concentrado predominantemente no papel pro inflamatório da substancia P (SP) (Petronilho et al., 2007; Keeble & Brain, 2004), bem como o papel imuno-modulador do neuropeptídio Y (Bedoui et al., 2004), a ação pro inflamatória da neuromedina U e o papel antiinflamatório da VIP (Niissalo et al., 2002). O mecanismo de ação destes neuropeptídios na modulação das doenças inflamatórias, é pelo menos em parte, devido a sua habilidade de afetar a produção de citocinas. Por exemplo, SP aumenta a produção de citocinas pró inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Cuesta et al., 2002), ao passo que VIP inibe a produção de citocinas pró inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-12 e estimula a produção de citocinas antiinflamatórias IL-10 e IL-1Ra (Delgado et al., 2004). GRP modula, como um estimulador ou inibidor, a função dos linfócitos (Medina et al., 1998; Medina et al.,

1999), fagócitos (De la Fuente et al., 1991), e células NK (Medina et al., 1998). Além disso, GRP induz a proliferação e quimiotaxia de mastócitos (Subramaniam et al., 2003).

Grimsholm et al. (2005) hipotetizaram que os neuropeptídeos pró-inflamatórios são a chave no papel da patogênese e manutenção da artrite reumatóide (RA), e eles relataram que existe uma correlação entre a concentração sinovial de GRP e citocinas pró-inflamatórias e a atividade da RA nestes doentes. Neste contexto relataram-se pela primeira vez os efeitos benéficos do antagonista seletivo do receptor GRP, RC-3095, e foi bem estabelecido num modelo experimental de sepse e lesão pulmonar aguda induzido por LPS (Dal-Pizzol et al., 2006). RC-3095 modula a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1) por ativação dos macrófagos, levando a diminuição da infiltração inflamatória e disfunção orgânica, melhorando então significativamente a mortalidade em modelos clínicos de sepse. Interessantemente, RC-3095 não modula a liberação de IL-10 antiinflamatório, sugerindo que a via intracelular modulada pela bombesina/GRP é seletiva para citocinas pró-inflamatórias (Petronilho et al., 2007). Em estudo realizado por Oliveira et al. (2008), encontraram efeitos benéficos do RC-3095 levando a uma diminuição do infiltrado inflamatório na artrite, sendo este o primeiro relato da eficácia visando a inibição do GRP em modelo de artrite. Foram avaliadas as citocinas INF- γ , IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-10 e notadamente os níveis séricos de todas foram trazidos para baixo semelhantes ao controle. Esses resultados demonstram que além de bloquear vários processos relacionados a danos articulares o RC-3095 inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, indicando um efeito inibitório da resposta imune sistêmica específica e inata (Oliveira et al., 2008). Então nosso grupo propôs um papel autócrino/parácrino do GRP na ativação de macrófagos por

sepsis e/ou LPS (Fig.(1)). levando a modulação de resposta pró-inflamatória, mas não anti-inflamatória e isto é consistente com o envolvimento de uma nova via inflamatória relevante com o desenvolvimento de doenças inflamatórias (Petronilho et al., 2007).

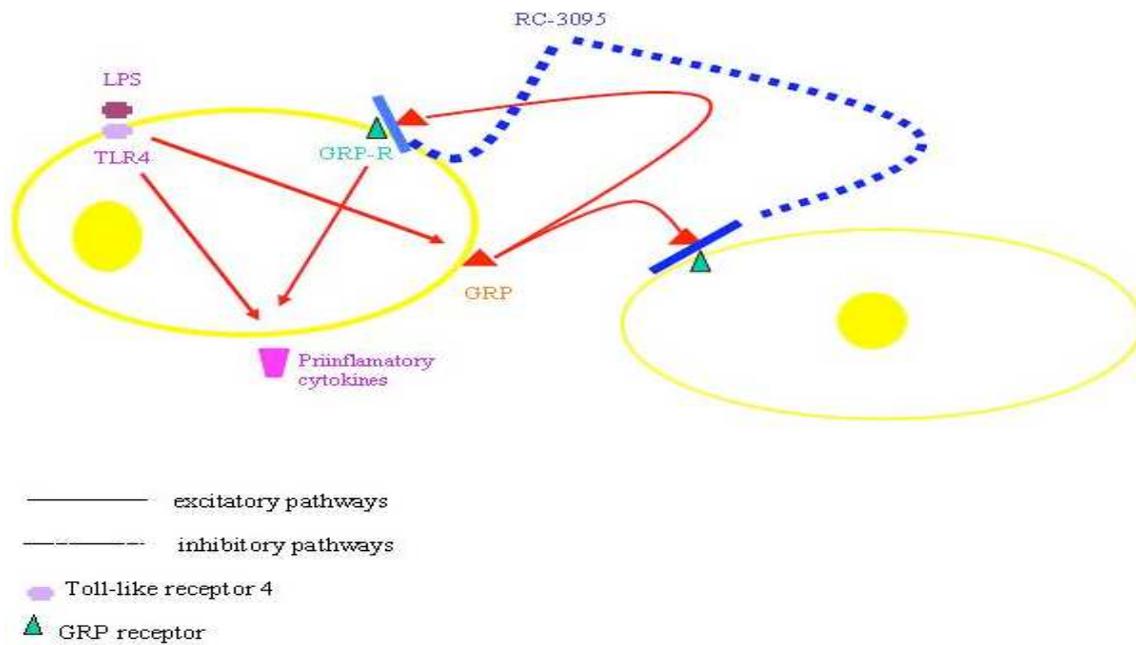


Fig. (1). Mecanismo proposto para interação entre LPS, GRP e macrófagos (Petronilho et al., 2007).

1.5- RC-3095:

Antagonistas dos receptores bombesina/GRP são conhecidos pelas patentes US 5244883 e CA 2097192 (Cornelio et al., 2007). A fórmula geral do RC-3095 é (d-Tpi₆,Leu₁₃ [CH₂NH]-Leu₁₄) bombesina (6-14); (Tpi é 2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]índole-3-ácido carboxílico). Este composto foi originalmente sintetizado no laboratório Schally e foi inicialmente concebido para o tratamento de tumores cancerígenos em humanos (Radulovic et al., 1991).

Até o presente, dentre os antagonistas da bombesina, o RC-3095 (Figura 2) mostrou ser um dos de maior potência terapêutica (Moody et al., 1985; Pinski et al., 1994; Qin et al., 1994). O RC-3095 exerce potente atividade inibitória em uma ampla variedade de neoplasias humanas que incluem linhagens estrógeno-dependentes e estrógeno-independentes em ratos (Qin et al., 1994; Avis et al., 1993), câncer pancreático induzido por nitrosaminas em “hamsters” (Coy et al., 1998; Heimbrook et al., 1989), câncer prostático androgênio-independente R-3327-AT-1 em ratos (Coy et al., 1989), câncer de cólon HT-29 (Saeed et al., 1989), câncer prostático PC-3, PC-82 e DU-145 (Cai et al., 1995; Camble et al., 1989), câncer pancreático humano CFPAC-1 e SW-19990, e linhagens de câncer gástrico MKN-45 (Mahmoud et al., 1991).

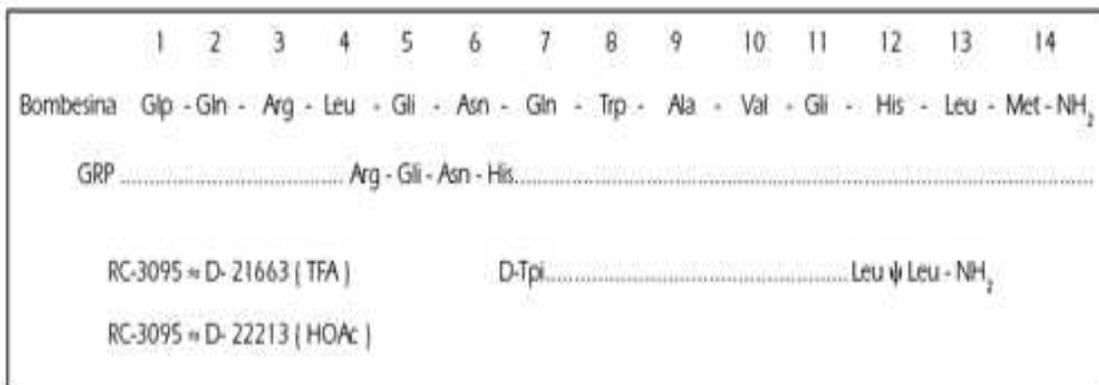


Figura 2. Estrutura do RC-3095

Resultados sugerem que o RC-3095 pode inibir a liberação de TNF- α e IL-1 β de macrófagos ativos, o que poderia representar um alvo farmacológico possível para controlar a inflamação sistêmica (Schwartzmann, 2005).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a eficácia do tratamento com RC- 3095 em modelo animal de uveíte induzida por injeção de LPS.

2.2 Objetivos Específicos:

- Comparar os efeitos da dexametasona com o RC-3095.
- Avaliar as alterações dos níveis de TNF- α e mieloperoxidase no humor aquoso
- Avaliar os níveis de TBARS e proteína carbonil nos tecidos da íris.

3.ARTIGO

Submetido a
Investigative Ophthalmology & Visual Science

**Effects of an antagonist of the gastrin-releasing
peptide receptor (GRPR) RC-3095 in animal model of uveitis**

David Valter Pereira ¹, Amanda Valnier Steckert ¹, Franciele Mina¹, Fabricia Petronilho ^{1,2} Rafael Roesler ^{3,4}, Gilberto Schwartzmann ⁴, Felipe Dal-Pizzol ^{1,2,1}

¹ Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Grupo de Pesquisa em Neurofarmacologia Celular e Molecular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil;

⁴ Laboratório de Pesquisas em Câncer, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

¹ Address requests for reprints to: Prof. Felipe Dal-Pizzol, MD, PhD - Laboratório de Fisiopatologia Experimental, PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. E-mail: piz@unesc.net

Abstract

Purpose: Several studies have shown the role of gastrin-releasing peptide (GRP) on the production and release of cytokines both in animal models and humans with inflammatory diseases, but there is no report on the effects of GRP in uveitis. We report on the effects of the GRP receptor (GRPR) antagonist, RC-3095, in a well-established model for uveitis induced by the administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids.

Methods: Adult male Wistar rats (weighing 250-300g, n=6 per group) were randomly divided into four groups: (1) saline (2) LPS + saline (3) LPS + dexamethasone (4) LPS + RC-3095. Two hours after LPS administration, RC-3095 (0.3mg/kg, single dose, subcutaneously) or dexamethasone (1mg/kg, each 6 hours, subcutaneously) were administered. After 24 and 48h rats were anesthetized and aqueous humor was sampled bilaterally by aspirating with a 30-G needle under microscope visualization, and the irides were removed. Aqueous humor TNF- α concentration and myeloperoxidase (MPO) activity were determined. In addition, oxidative damage to the irides was determined by the measure of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl content.

Results: The acute administration the RC-3095 exhibited pronounced anti-inflammatory actions, characterized by a marked reduction of myeloperoxidase activity and a decrease on TNF α levels. In addition, RC-3095 elicit important action against irides oxidative damage.

Conclusions: These findings suggest that GRP participate in the inflammatory response in an animal model of uveitis, being the GRPR a target to new therapeutic options in the treatment of uveitis.

Keywords: uveitis; lipopolysaccharide; dexamethasone; Gastrin-releasing peptide receptor; RC-3095; Inflammation; Oxidative damage.

1. Introduction

Uveitis is an important cause of blindness worldwide, its incidence is reported in the United States within a range that varies from 17 per 100.000 to 24 per 100.000 inhabitants per year, and its prevalence of 38 per 100.000 to 204 per 100.000 inhabitants per year (1).

The pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, interferon- γ and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have all been detected within the ocular fluids or tissues in the inflamed eye together with others, such as IL-4, IL-5, IL-10 and transforming growth factor- β . The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and fractalkine are also thought to be involved in the associated inflammatory response. (2-6). In addition, in experimental autoimmune uveitis, peripheral activation of T cells is required. Therefore, anything affecting priming of Th1 cells will likely affect experimental autoimmune uveitis. Indeed, a pivotal role for antigen-specific CD4+ Th1 cells and pro-inflammatory cytokine-mediated disease has been demonstrated in both rat and mouse experimental autoimmune uveitis with nude rats, devoid of T cells, unable to develop experimental autoimmune uveitis (7).

The evidence for the involvement of neuropeptides in inflammatory diseases has focused predominantly on a proinflammatory role for substance P (SP) (8,9), as well as an immuno-modulator role for neuropeptide Y (10), the proinflammatory action of neuromedin U (11) and an anti-inflammatory role for VIP (12). The mechanism of action of these neuropeptides in modulating inflammatory diseases is, at least in part, due to their ability to affect cytokine production. For example, SP increases the production of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 α (13), whereas VIP inhibits the production of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-12 and stimulates the production of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1Ra (14). Bombesin-like peptides (BLP) and its receptors are widely distributed in mammalian peripheral tissues and in the central nervous system. Recently, effects of these peptides on the production and release of cytokines were described both in animal models and humans with inflammatory diseases (8), but

there is no description in the literature to a role for BLP in the inflammatory response during uveitis development. Thus we here, using a pharmacological tool, demonstrated a role for gastrin releasing peptide in the development of the inflammatory response in an animal model of uveitis.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Male Wistar rats weighing 250–300 g were used. The animals were caged at 22 C, with 12-h light:12-h dark cycle and free access to food and water until the time of experiments. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) Guide for Care and Use of Animals and with the approval of our institutional Ethics Committee. Experimental animals were first randomly divided into four groups named as: (1) saline, (2) LPS + saline, (3) LPS + dexamethasone (4) LPS + RC-3095. Uveitis was induced by the administration of LPS (*Escherichia coli*, serotype 055: B5, from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µg/100 µl of pyrogen-free 0.9% sodium chloride into subcutaneous tissue. 2h after LPS administration, GRP receptor antagonist RC-3095 (0.3mg/kg, single dose, subcutaneously), originally synthesized in the Schally laboratory by solid-phase methods (15), was donated by Zentaris (Frankfurt am Main, Germany), or dexamethasone (1mg/kg, administered each 6 hours for 48 hours, subcutaneously) were administered. RC-3095 doses were based on previous experiments (15). After 24 and 48h rats had been anesthetized with ketamine chlorohydrate (Ketalar, Parke Davis, 50 mg/kg) and xylazine 2% (Rompun, Bayer, 20 mg/kg) and aqueous humor were sampled bilaterally by aspirating with a 30-G needle under microscope visualization. In addition, the irides were surgically excised and stored at -80°C to posterior analyses.

2.2 Aqueous humor inflammatory response

The concentrations of TNF- α in aqueous humor were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) according to the manufacturer instructions. As an index of neutrophil infiltration we measure myeloperoxidase activity as previously described (16). Briefly, aqueous humor was homogenized (50 mg/mL) in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 15,000 $\times g$ for 40 mins. An aliquot of supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM H₂O₂. Activity was measured spectrophotometrically as the change in absorbance at 650 nm at 37°C

2.3 Irides oxidative damage

Since the aqueous humor inflammation could induce irides damage we determined the occurrence of irides oxidative damage measuring TBARS and protein carbonyl levels.

The formation of TBARS during an acid-heating reaction is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described by (17). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid. Subsequently, they were heated in a boiling water bath for 30 min. Malondialdehyde (MDA) equivalents were determined by the absorbance at 532 nm using 1,1,3,3- tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein)

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups content, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by (18). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH, and the absorbance was monitored at 370 nm.

2.4 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.D (n=6 each group). Significance was accepted at $p < 0.05$ levels. Differences between were determined by ANOVA followed by Tukey test. All statistical analyses were performed using the statistical package SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1 Aqueous humor inflammatory response

LPS induces, as expected, inflammatory alterations in aqueous humor as determined by an increase in TNF- α levels (Figures 1A and 1B) and increase myeloperoxidase activity (Figures 2A and 2B) 24h and 48h after its administration. The blockade of GRPR by RC-3095 was able to decrease TNF- α levels both at 24h and 48h after LPS (Figures 1A and 1B), and this effect was more pronounced when compared to dexamethasone (Figures 1A and 1B). The decrease on TNF- α levels was followed by a decrease on myeloperoxidase activity in RC-3095 treated animals (Figures 2A and 2B). Interestingly dexamethasone induced an increase on myeloperoxidase activity both 24h and 48h after LPS administration (Figures 2A and 2B).

3.2 Irides oxidative damage

The inflammatory response to LPS induces oxidative damage in the irides observed as an increase in TBARS and protein carbonyl levels (Figures 3 and 4). Both treatments were able to decrease irides oxidative damage at 24h, but not 48h (Figures 3 and 4).

4. Discussion

In the present study, the administration of RC-3095 2h after LPS injection significantly reduced the inflammation in the anterior chamber, even when administered as a single dose. RC-3095 effects seemed to be superior to the continuous administration of dexamethasone, suggesting that the anti-inflammatory effects of inhibiting GRPR was higher than of glucocorticoids.

Several new therapeutic agents had been tested in the LPS model of uveitis. In general these agents are effective to decrease inflammation in this model when administered before or immediately after LPS (19-21). In our model the administration of a single dose of RC-3095 was superior to multiple dexamethasone doses, even when administered 2 h after LPS. The blockade of GRPR was able to decrease TNF- α and myeloperoxidase in the aqueous humor until 48h after LPS administration, suggesting that the GRPR is involved in long-term inflammation in the uveal tract. It was unexpected that dexamethasone seemed to increase some of these inflammatory parameters when administered after LPS. Despite the observed effect on TNF- α levels, dexamethasone did not decrease myeloperoxidase activity. Elgebaly and collaborators demonstrated that dexamethasone was not able to decrease neutrophil infiltration in hydrogen peroxide-injured corneas (22). The influx of neutrophil to the anterior chamber is dependent on local production of chemokines (2), thus we suppose that RC-3095, but not dexamethasone, could decrease chemokines production, thus presenting a more important anti-inflammatory effect when compared to dexamethasone.

Several reports have demonstrated that the production of reactive species such as superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^-) and peroxynitrite occurs at the site of inflammation and contributes to tissue damage (23,24). Reactive oxygen species (ROS) could be mediators of inflammation induced by cytokines and chemokines, which in turn induce intracellular ROS generation by mitochondrial respiratory chain reaction, the arachidonic metabolic reactions, and the membrane-bound superoxide-generating enzyme NADPH oxidase. Further, ROS activate redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B and AP-1, which play a

central and crucial role in uveal tract inflammation (25). Zhang and collaborators (26) showed that NF- κ B translocation and expression of E-selectin, TNF- α , and IL-6 are involved in the pathogenesis of LPS-induced uveitis (27). All the GRPR characterized to date are guanine nucleotide binding protein (G-protein)-coupled, have seven transmembrane domains, and activate phospholipase C to increase intracellular concentrations of inositol phosphates, diacyl glycerol and calcium. Among the multiple intracellular signaling pathways that mediate the effects of GPCRs, a family of related serine-threonine kinases, collectively known as ERKs or MAPKs, appear to play a central role (28). The induction of AP-1 by is primarily mediated by the JNK and p38 MAPK cascades (29). In addition, Levine and collaborators showed that bombesin stimulates NF- κ B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells (30). Therefore, the decrease of inflammatory response and oxidative damage in LPS-induced uveitis attributed by GRPR, RC-3095 it can be involved in regulation of NF- κ B activation.

In conclusion, the present results support the view that in LPS-induced uveitis model, gastrin-releasing peptide receptor antagonist, RC-3095 has strong anti-inflammatory properties that it can be related with the reduction of oxidative damage. Thus this show the direct evidence that RC-3095 plays a pivotal role in acute inflammation and that it is an excellent target by therapeutic applications.

References

- 1 Fernandes LC, Castro FM, Oréfica F. *Epidemiologia das uveítes*. Rio de Janeiro, RJ:Cultura Médica; 2000: 31-33.
- 2 Ooi KG, Galatowicz G, Calder VL, Lightman SL. Cytokines and Chemokines in Uveitis- Is there a correlatinon with clinical phenotype? *Clin Med Res*. 2006; 4(4): 294-309.
- 3 Crane IJ, Mckillop-Smith S, Wallace CA, Lamont GR, Forrester JV. Expression of the chemokines MIP-1alpha, MCP-1, and RANTES in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(7):1547-1552.
- 4 Wang LM, Kitteringham N, Mineshita S, Wang JZ, Nomura Y, Koike Y, Miyashita E. The demonstration of serum interleukin-8 and superoxide dismutase in Adamantiades-Behcet's disease. *Arch Dermatol Res*. 1997; 298(8):444-447.
- 5 Mantas C, Direskeneli H, Oz D, Yavuz S, Akoglu T. IL-8 producing cells in patients with behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18(2):249-251.
- 6 Verma MJ, Lloyd A, Rager H, Strieter R, Kunkel S, Taub D, Wakefield D. Chemokines in acute anterior uveitis. *Curr Eye Res*. 1997; 16(12):1202-1208.
- 7 Nussenblatt RB. Experimental autoimmune uveitis: mechanisms of disease and clinical therapeutic indications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32:3131-3141.
- 8 Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007; 6(4):197-200.
- 9 Keeble JE, Brain SD. A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett*. 2004; 361(1-3):176-179.
- 10 Bedoui S, Miyake S, Straub RH, Von Horsten S, Yamamura T. More sympathy for autoimmunity with neuropeptide Y? *Trends Immunol*. 2004; 25(10):508-512.

- 11 Moriyama M, Sato T, Inoue H, Fukuyama S, Teranishi H, Kangawa K, Kano T, Yoshimura A, Kojima M. The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells *J Exp Med.* 2005; 202(2): 217–224
- 12 Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, Konttinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann NY Acad. Sci.* 2002; 966:384-399.
- 13 Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int.* 2002; 40(4):301-306.
- 14 Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(2):249-290.
- 15 Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens-Gelain D, Zanotto-Filho A, De Souza LF, Andrades M, Barbeiro DF, Bernard EA, Cammarota M, Bevilaqua LR, Soriano FG, Moreira JCF, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(1):84-90.
- 16 De Young M, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989; 26:335-341.
- 17 Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421–431.
- 18 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464–478.

- 19 Yadav UC, Srivastava SK, Ramana KV. Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(10): 4634-4642.
- 20 Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, Cui HS, Hayasaka Y. A cholinergic agonist attenuates endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(6): 2719-2725.
- 21 Poulaki V, Iliaki E, Mitsiades N, Mitsiades CS, Paulus YN, Bula DV, Gragoudas ES, Miller JW. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J.* 2007; 21(9): 2113-2123.
- 22 Elgebaly SA, Miano D, Ehlers W, Rahhal F, Tyles E, El-Kerm AF. The induction of anterior chamber inflammation by factors released from hydrogen peroxide-injured corneas: effect of dexamethasone and indomethacin. *J Ocul Pharmacol.* 1994; 10(1): 295-306.
- 23 Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Riley DP, Serraino I, Caputi AP, Cuzzocrea S. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 815–827.
- 24 Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 135–159.
- 25 Rocksén D, Lillehook B, Larsson R, Johansson T, Bucht A. Differential anti-inflammatory and antioxidant effects of dexamethasone and *N*-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2000; 122: 249–256.
- 26 Zhang XY, Hayasaka S, Hayasaka Y; Cui HA, Chi ZL. Effect of *N*-Acetylcysteine on Lipopolysaccharide-Induced Uveitis in Rats. *Jpn J Ophthalmol.* 2007; 51:14–20

- 27 Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, Hayasaka Y, Cui HA. Effects of rolipram, a selective inhibitor of type 4 phosphodiesterase, on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:2497–2502.
- 28 Hellich MR, Ives KL, Udipi V, Soloff MS, Greeley GH Jr, Chistensen BN, Townsend CM. Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J Biol Chem.* 1999; 274: 23901-23909.
- 29 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40.
- 30 Levine L, Lucci JA, Pazdrak B, Cheng JZ, Guo YS, Townsend CM Jr, Hellmich MR. Bombesin stimulates nuclear factor κ B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 3495-3502.

Figure Legends

Figure 1. Effects of RC-3095 in a TNF- α levels in aqueous humor 24h **(A)** and 48h **(B)** after administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids. Data are express as means \pm SD. $p < 0.05$, *different from saline, **different from LPS + saline.

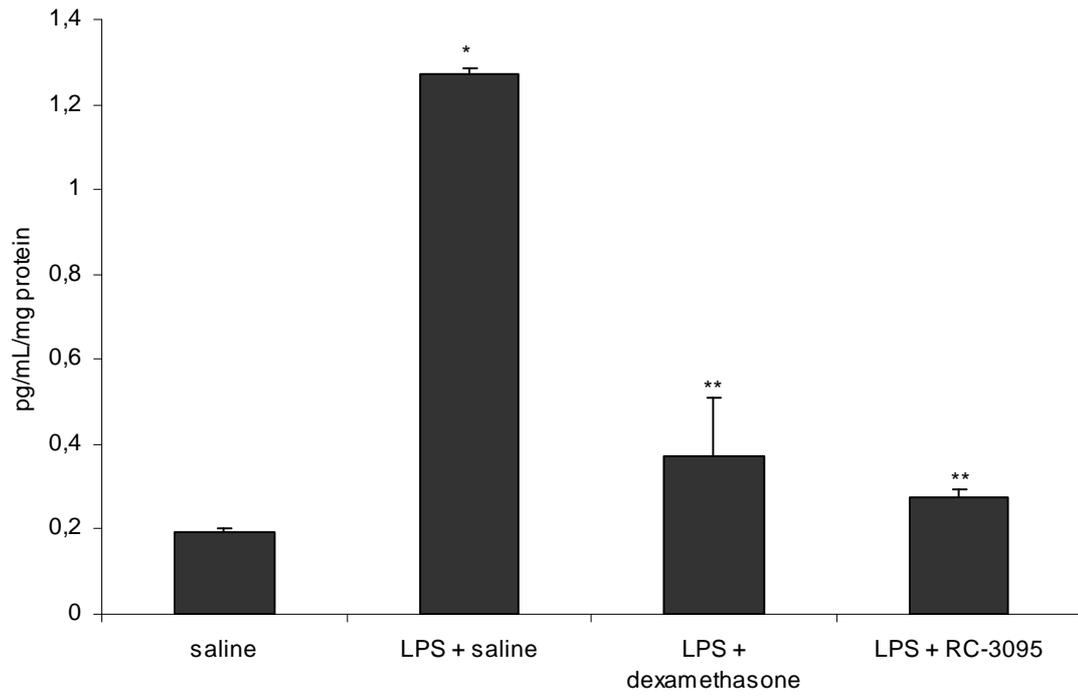
Figure 2. Effects of RC-3095 in a MPO activity levels in aqueous humor 24h **(A)** and 48h **(B)** after administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids. Data are express as means \pm SD. $p < 0.05$, *different from saline, **different from LPS + saline and ***different from LPS + dexamethasone.

Figure 3. Effects of RC-3095 in a TBARS levels in irides, 24 and 48 hours after administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids. Data are express as means \pm SD. $p < 0.05$, *different from saline, **different from LPS + saline.

Figure 4. Effects of RC-3095 in a protein carbonyls levels in irides, 24 and 48 hours after administration of lipopolysaccharide (LPS) comparing its effects to glucocorticoids. Data are express as means \pm SD. $p < 0.05$, *different from saline, **different from LPS + saline and ***different from LPS + dexamethasone.

Figure 1

A



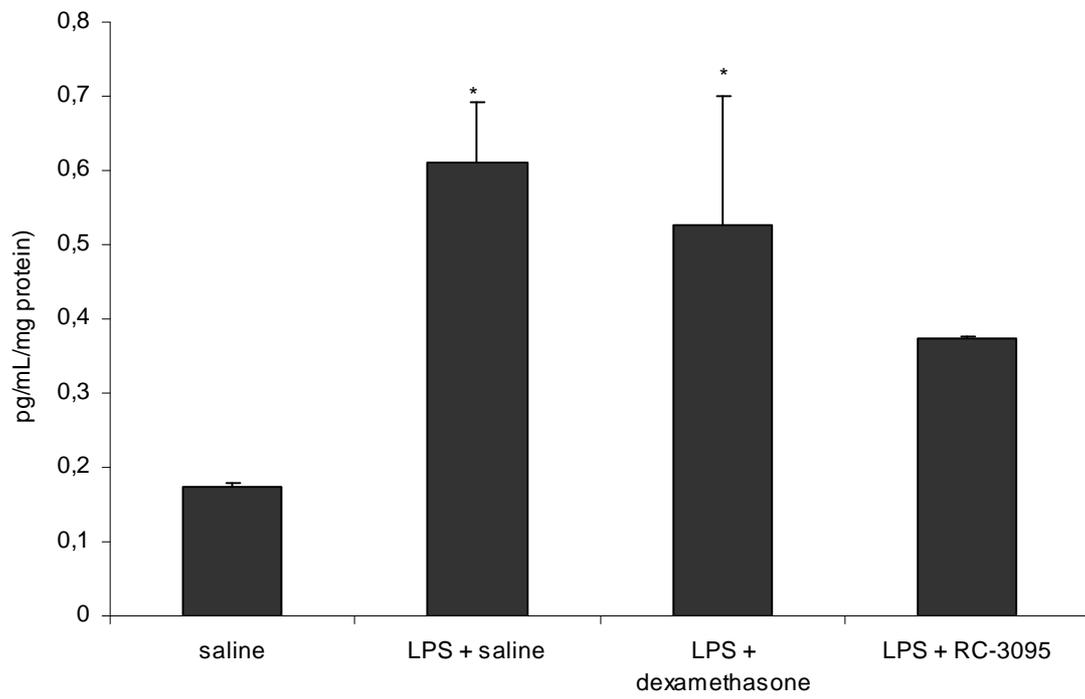
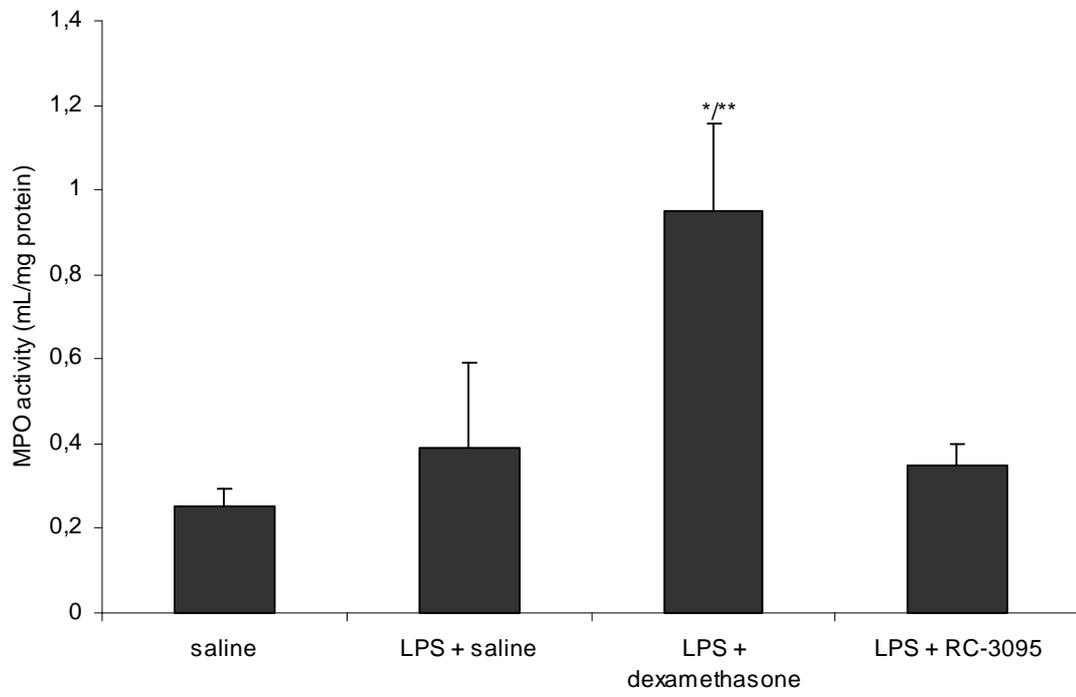
B

Figure 2

A



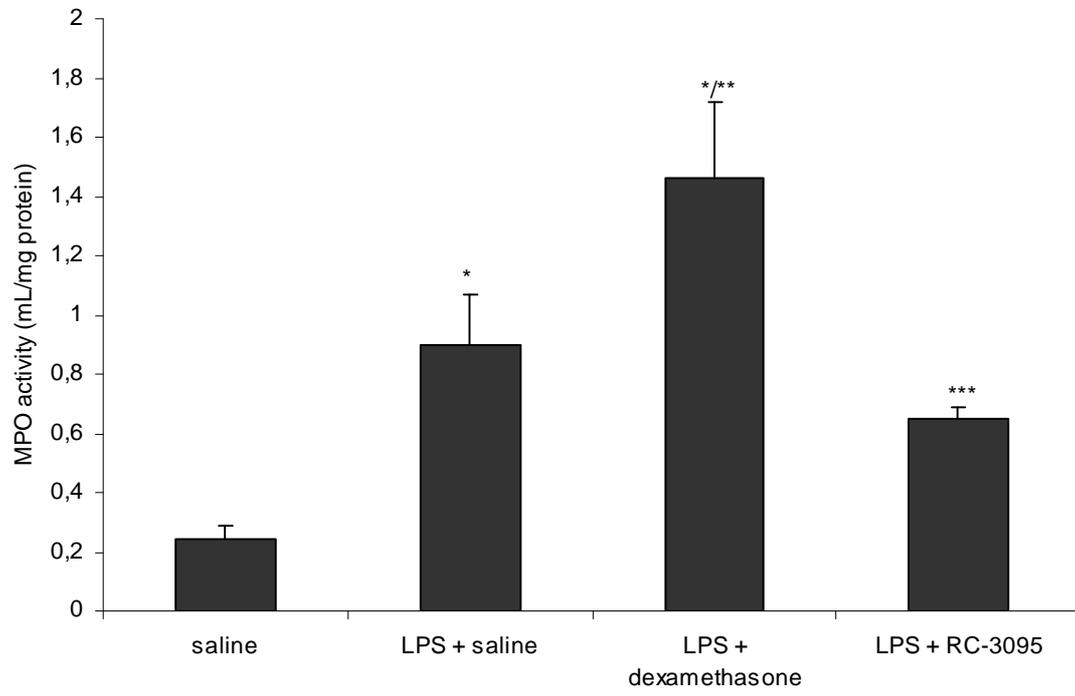
B

Figure 3

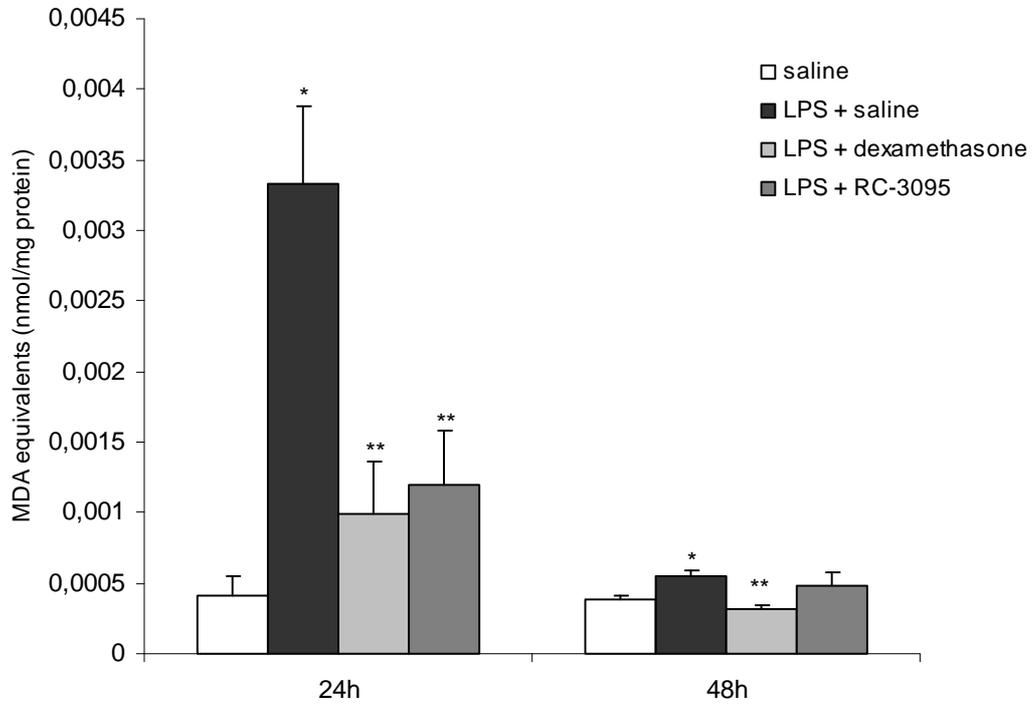
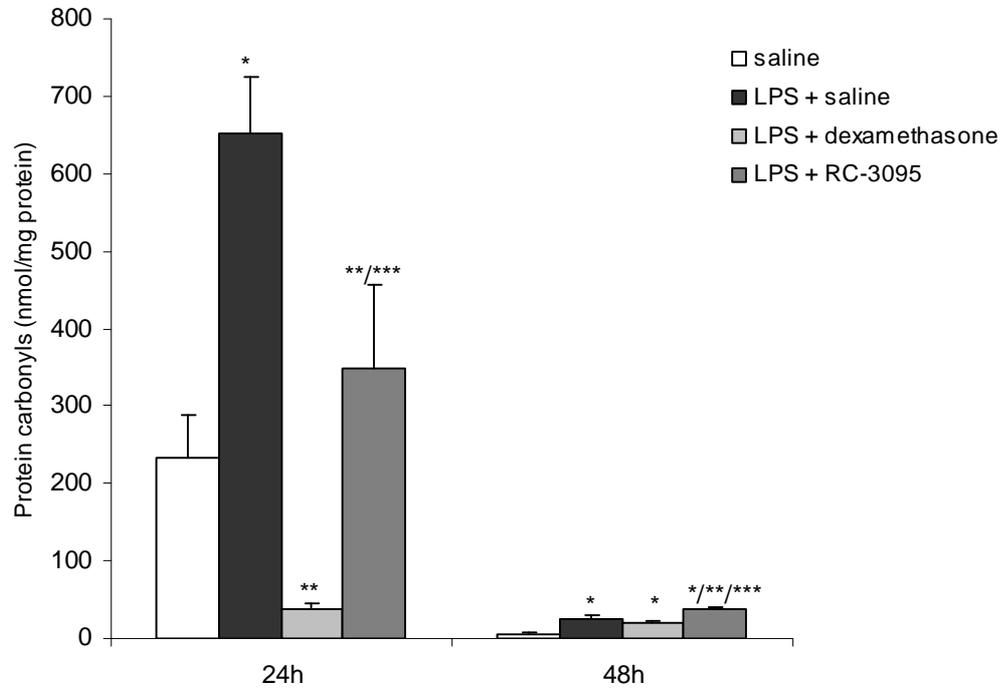


Figure 4



4.DISCUSSÃO

A inflamação aguda pode levar a importantes efeitos deletérios no olho diminuindo a acuidade visual. Algumas seqüelas como catarata são tratadas, mas outras como o glaucoma e a isquemia vascular retiniana podem causar perda visual irreversível. Quando são administrados em uma desordem inflamatória ocular ou sistêmica, efeitos colaterais como glaucoma e catarata podem ocorrer (Kenneth et al., 2006).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pleiotrópica sintetizada principalmente pelos monócitos, macrófagos e linfócitos T, e com menos intensidade pelos neutrófilos e mastócitos, em resposta a infecções ou doenças imunológicas. O TNF promove inflamação por citotoxicidade direta, bem como por vários mecanismos indiretos incluindo a regulação da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, mediadores do ácido araquidônico, liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, metaloproteinases, quimiocinas, moléculas de adesão, e fatores angiogênicos (Bazzoni & Beutler, 1996; Feldmann & Maini, 2001).

No presente estudo a uveíte foi induzida pela administração de LPS (*Escherichia coli*, serotype 055: B5, from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e foram encontrados efeitos semelhantes ao de Zang XY et al. (2007). O LPS estimula diversas células a produzir citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Hoekzema et al., 1992; De Vos et al., 1994; Bucolo et al., 2003; Haddad et al., 2002; Harrison et al., 2004; Chi et al., 2004), no presente estudo a concentração de TNF- α foi elevada no humor aquoso 24 e 48h após a administração do LPS. Nossos achados foram consistentes com relatos de outros (De Voz et al., 1994) e prévios estudos (Chi et al., 2004), comprovando que em nosso modelo a uveíte foi instalada. A administração de RC-3095 2h após a injeção LPS reduziu significativamente a

inflamação na câmara anterior, mesmo quando administrada em dose única. Os efeitos do RC-3095 parecem ser superior ao da administração contínua de corticosteróides, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios do inibidor GRPR foi superior ao dos glicocorticóides.

A mieloperoxidase (MPO) representa índices de maior atividade leucocitária, e é uma enzima contida nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos (Moberg et al., 1983; Nakamuta et al., 1993; Matthews et al., 1985; Klebanoff & Clark, 1978; Kirsch et al., 2000). Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes (Bos et al., 1987). Esta enzima catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de um halogênio, constituindo a ligação peróxido de hidrogênio-halogênio-MPO um sistema altamente tóxico para os microorganismos (Moberg et al., 1983). Os grânulos dos neutrófilos contendo MPO são libertados mediante estimulação por imunocomplexos por catecolaminas ou durante a morte celular (Nakamuta et al., 1993; Klebanoff et al., 1976; Johnson et al., 1987). A MPO é responsável pela quase totalidade da atividade epinefrina oxidase do plasma (EO) que oxida a epinefrina a adrenocrômio (Matthews et al., 1985), num processo que envolve a geração de formas reactivas de oxigênio (Misra & Fridovich, 1972; Powis, 1979).

Vários novos agentes terapêuticos foram testados em modelo de uveíte por LPS. Em geral, estes agentes são eficazes para diminuir a inflamação neste modelo quando administrados antes ou imediatamente após o LPS (Yadav et al., 2007; Chi et al., 2007; Poulaki et al., 2007). O nosso modelo de administração de uma dose única de RC-3095 foi superior a múltiplas doses de dexametasona, mesmo quando administrados 2 horas após LPS. O bloqueio do GRPR foi capaz de diminuir os

níveis de TNF- α e mieloperoxidase no humor aquoso até 48h após a administração de LPS, sugerindo que o GRPR está envolvido a longo prazo na inflamação do trato uveal. Foi inesperado o fato de que parecia a dexametasona aumentar alguns desses parâmetros inflamatórios quando administrado após LPS. Apesar dos efeitos observados nos níveis de TNF- α , a dexametasona não diminuiu a atividade da mieloperoxidase. Elgebaly et al. (1994) demonstraram que a dexametasona não foi capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos em córneas traumatizadas por peróxido de hidrogênio. O afluxo de neutrófilos para a câmara anterior é dependente da produção local de quimiocinas (Kenneth et al., 2006), assim nós supomos que o RC-3095, mas não a dexametasona, pode diminuir a produção de quimiocinas, apresentando, assim, mais um importante efeito anti-inflamatório quando comparado com a dexametasona.

Quando o oxigênio é parcialmente reduzido, tanto na fosforilação oxidativa quanto em outras reações, há formação de radicais livres, que constituem moléculas com coexistência independente (o que explica o uso do termo “livre”) e que contém um ou mais elétrons não pareados na camada de valência. Esta configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meias-vidas relativamente curtas e quimicamente muito reativas (Ferreira & Matsubara, 1997). O estresse oxidativo no ambiente celular resulta da hidroperoxidação de lipídios altamente reativos e instáveis (Yagi, 1988; Armstrong & Browne, 1994). A instável decomposição de peróxidos derivados de ácidos graxos poliinsaturados resulta na formação do malondialdeído (MDA) (Alexandrova & Bochev, 2005; Cherubini et al., 2005), que pode ser quantificado colorimetricamente pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este é um método bem estabelecido para o acompanhamento da peroxidação de lipídios (Yagi, 1998; Armstrong & Browne,

1994). As espécies reativas do oxigênio (EROs) podem danificar todos os tipos de moléculas biológicas, sendo as proteínas alvos imediatos para a modificação oxidativa. O dano à estrutura protéica pode alterar sua atividade biológica, sendo que no caso de enzimas, poderia resultar em modificação de sua atividade catalítica. Além disso, estas alterações ainda poderiam causar prejuízo no transporte ativo através das membranas celulares e citólise (Dean et al., 1997). A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (Berlett & Stadman, 1997; Beal et al., 2003; Donne et al., 2003).

Vários relatos têm demonstrado que a produção de espécies reativas, como radicais ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e peroxinitrito ocorre no local da inflamação e contribui para o dano tecidual (Salvemini et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2001). As espécies reativas de oxigênio são mediadores da inflamação induzida por citocinas e quimiocinas, que por sua vez, induz a geração intracelular de ROS por reação em cadeia respiratória mitocondrial, as reações metabólicas do ácido araquidônico e, a membrana de vínculo enzima superóxido geradora de NADPH oxidase. Além disso, ROS ativam redox-sensíveis, tais como fatores transcrição NF- κ B e AP-1, que desempenham um papel central e decisivo para inflamação no trato uveal (Rocksen et al., 2000). Zhang et al. (2007) (Zhang et al., 2007) mostrou que a translocação do NF- κ B, a expressão da E-selectina, TNF- α e IL-6 estão envolvidos na patogênese do LPS induzindo uveíte (Chi et al. 2004). Todos os GRPR caracterizados até hoje são vinculados a proteína nucleotídeo guanina (G-protein)-acoplados, têm sete domínios transmembrana, e ativam a fosfolipase C para aumentar as concentrações intracelulares de fosfato inositol, glicerol diacil e cálcio. Entre as várias vias

sinalizadoras intracelulares que medeiam os efeitos dos GPCRs, uma família relacionada com a serina treonina-quinases, coletivamente conhecidas como ERKs ou MAPKs, parecem desempenhar um papel central (Hellich et al., 1999). A indução da AP-1 é primariamente mediada pela cascata JNK e p38 MAPK (Chang & Karin, 2001). Além disso, Levine e colaboradores demonstraram que a bombesina estimula a ativação do NF- κ B e expressão de fatores pró-angiogênicos em células cancerígenas da próstata (Levine et al., 2003). Por conseguinte, o RC-3095 pode estar envolvido na diminuição da resposta inflamatória e do dano oxidativo em uveíte induzida por LPS atribuído ao GRPR, pela regulação da ativação do NF- κ B.

Em conclusão, os presentes resultados dão apoio a opinião de que nos modelos de uveíte induzidos por LPS, o antagonista dos receptores do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095 tem fortes propriedades anti-inflamatórias e que ele pode estar relacionado com a redução dos danos oxidativos. Assim, evidências diretas mostram que o RC-3095 desempenha um papel fundamental na inflamação aguda e que é um excelente alvo para aplicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS:

- ANASTASI A; ERSPAMER V; BUCCI M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombesina and Alytes. **Experimentia** 27: 166-169.1971.
- ABBAS AK; LICHTMAN AH. **Imunologia Celular e Molecular** Elsevier, 5ª edição, Rio de Janeiro, pp. 251-294. 2005.
- AGUAYO SM; KANE MA; TALMADGE EK; SCHWARZ MI; GRAUER L; MILLER YE. **J. Clin. Invest.** 84: 1105. 1989.
- AGUAYO SM; TALMADGE EK; WALDRON JA JR; SHERRIT KM.;KANE M.A; MILLER YE. **J. Clin. Invest.** 86: 838. 1990.
- ALEXANDROVA ML; BOCHEV PG. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biol. & Med.** 39: 297-316. 2005.
- APRIKIAN AG; TREMBLAY L; HAN K; CHEVALIER S. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. **Int. J. Cancer**; 72: 498-504.1997.
- ARMSTRONG D; BROWNE R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Free Radicals in Med. Diag.** 366: 43-58, 1994.
- AVIS I; JETT M; KASPRZYK PG; CUTTITTA F; TRESTION AM; MANECKJEE R; MULSHINE JL. Effect of gastrin-releasing peptide on the pancreatic tumor cell line (Capan). **Mol. Carcinog.** 8: 214-220. 1993.
- BAZZONI F; BEUTLER B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N. Engl. J. Med.** 334: 1717–1724. 1996.

- BEAL MF; HYMAN B T; KOROSHETZ W. Do defects in mitochondrial metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease? **Trends in Neurosci.** 16: 125-131. 2003.
- BEDOUI S; MIYAKE S; STRAUB RH; VON HORSTEN S; YAMAMURA T. **Trends Immunol.** 25: 508. 2004.
- BERLETT BS; STADMAN ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **J. Biol. Chem.** 272: 20313-20316. 1997.
- BOS A; VEVER R; ROOS D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochim. Biophys. Acta.** 525: 37-44. 1987.
- BUCOLO C; CUZZOCREA S; MAZZON E; CAPUTI A. Effects of cloricromene, a coumarin derivative, on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 44: 1178–1184. 2003.
- BUNNETT N. Gastrin releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ (editors): Gut Peptides: **Biochim. and Physiol.**. New York, Raven Press. 423-445. 1994.
- CAI R.-Z; QIN Y; ERTL T; SCHALLY AV. New pseudo-nonapeptide bombesin antagonists with C-terminal LeuY(CH₂N)Tac-NH₂ showing high binding affinity to bombesin/ GRP receptors on CFPAC-1 human pancreatic cancer cells. **Int. J. Oncol.** 6: 1165-1172. 1995.
- CAMBLE R; COTTON R; DUTTA AS. N-isobutyryl-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-NHMe (ICI 216140) a potent in vivo antaconsin analogue of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) derived from the C-terminal sequence lacking the final methionine residue. **Lif. Sci.** 45: 1521-1527. 1989.
- CHANG L; KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature** 410: 37-40. 2001.

- CHERUBINI A; RIGGIERO C; POLIDORI C; MECOCCI P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biol. & Med.** 39: 841-852. 2005.
- CHI ZL; HAYASAKA S, ZHANG XY, HAYASAKA Y, CUI HA. Effects of rolipram, a selective inhibitor of type 4 phosphodiesterase, on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 45: 2497–2502. 2004.
- CHI ZL, HAYASAKA S, ZHANG XY, CUI HS, HAYASAKA Y. A cholinergic agonist attenuates endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 48: 2719-2725. 2007.
- CORNELIO DB; F DAL-PIZZOL; ROESLER R; SCHWARTSMANN G. Targeting the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor to treat sepsis. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery** 02: 131-139. 2007.
- CORNELIO DB; ROESLER R; SCHWARTSMANN G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental cancer therapy. **Ann. Oncol.** 1457-1466. 2007.
- COY DH; HEINZ-ERIAN P; JIANG N.-Y; SASAKI Y; TAYLOR J; MOREAU JP; WOLFREY WT; GARDNER JD; JENSEN RT. Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity. **J. Biol. Chem.** 263: 5056-5060. 1988.
- COY DH; TAYLOR JE; JIANG N.-Y; KLEIN S.H; WANG LH; HUANG S; MOREAU JP; GARDNER JD; JENSEN RT. Short-chain pseudopeptide bombesin receptor antagonists with enhanced binding affinities for pancreatic acinar and Swiss 3T3 cells display strong antimitotic activity. **J. Biol. Chem.** 264: 14691-14697. 1989.
- CRANE IJ; MCKILLOP-SMITH S; WALLACE CA; LAMONT GR; FORRESTER JV. Expression of the chemokines MIP-1 α , MCP-1, and RANTES in

- experimental autoimmune uveitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 42: 1547-52. 2001.
- CUESTA M C; QUINTERO L; PONS H; SUAREZ-ROCA H. **Neurochem. Int.** 40: 301. 2002.
- CUZZOCREA S; RILEY DP; CAPUTI AP; SALVEMINI D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol. Rev.** 53: 135–159. 2001.
- DAL-PIZZOL F; DI LEONE LP; RITTER C; MARTINS MR; REINKE A; PENS GELAIN D; ZANOTTO-FILHO A; DE SOUZA LF; ANDRADES M; BARBEIRO DF; BERNARD EA; CAMMAROTA M; BEVILAQUA LR; SORIANO FG CLÁUDIO J; MOREIRA F; ROESLER R; SCHWARTSMAN Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 173: 84. 2006.
- DEAN RT; FU S; STOCKER R; DAVIES MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Bioch. J.** 324: 1-18. 1997.
- DELGADO M; POZO D; GANEA D. **Pharmacol. Rev.** 56: 249. 2004.
- DE LA FUENTE M, DEL RIO M, FERRANDEZ MD, HERNANZ A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrinreleasing peptide and neuromedin C. **Immunology** 73: 205-211. 1991.
- DE KOZAK Y, VERWAERDE C. Cytokines in immunotherapy of experimental uveitis. **Int. Rev. Immunol.** 21: 231-253. 2002.
- DE VOS AF; VAN HAREN MA; VERHAGEN C; HOEKZEMA R; KIJLSTRA A. Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin induced uveitis in the rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 35: 1100–1106. 1994.

- DE YOUNG IM; KHEIFETS JB; BALLARON SJ; YOUNG JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions** 26: 335-341. 1989.
- DICK AD; FORRESTER JV; LIVERSIDGE J, Cope AP. The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). **Prog. Retin. Eye Res.** 23: 617-637. 2004.
- DONNE ID; ROSSI R; GIUSTARINI D; MILZANI A; COLOMBO R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Acta.** 329: 23-38. 2003.
- DRAPER HH; HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** 186: 421–431. 1990.
- ELGEBALY SA, MIANO D, EHLERS W, RAHHAL F, TYLES E, EL-KERM AF. The induction of anterior chamber inflammation by factors released from hydrogen peroxide-injured corneas: effect of dexamethasone and indomethacin. **J. Ocul. Pharmacol.** 10: 295-306. 1994.
- FELDMANN M; MAINI RN. Anti-TNF-a therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu. Ver. Immunol.** 19: 163–196. 2001.
- FERNANDES LC; CASTRO FM; ORÉFICE F; **Epidemiologia das uveítes.** In: Oréfice f. Uveíte clínica e cirúrgica: texto e atlas. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 31-33. 2000.
- FERREIRA ALA; MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Méd. Bras.** 43: 61-68. 1997.
- GOSNEY JR; SISSONS MCJ; ALLIBONE RD; BLAKEY AF. Pulmonary endocrine cells in chronic bronchitis and emphysema. **J.Pathol.** 147: 127-133. 1989.

- GOUVEIA EB; YAMAMOTO JH; ABDALLA M; HIRATA CE; KUBO P; OLIVALVES E;
Causas das uveites em serviço terciário em São Paulo, Brasil. **Arq. Bras. Oftalmol.** 67: 139-145. 2004.
- GRIMSHOLM, O; RANTAPAA-DAHLQVIST, S; FORSGREN, S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.** 7: R416. 2005.
- HADDAD JJ; LAND SC; TARNOW-MORDI WO; ZEMBALA M; KOWALCZYK D; LAUTERBACH R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. Differential regulation of lipopolysaccharide-mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor- α) biosynthesis in alveolar epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 300: 559-566. 2002.
- HARRISON LM; VAN HAAFTEN WCE; TESH VL. Regulation of proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. **Infect. Immun.** 72: 2618–2627. 2004.
- HEIMBROOK DC; SAARI WS; BALISHIN NL; FRIEDMAN A; MOORE KS; RIEMEN MW; KIEFER DM; ROTBERG NS; WALLEN JW; OLIFF A. Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. **J. Biol. Chem.** 264: 11258-11262. 1989.
- HELMICH MR; IVES KL; UDUPI V; SOLOFF MS; GREELEY GH Jr; CHRISTENSEN BN; TOWNSEND CM. Jr. Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. **J. Biol. Chem.** 274: 23901. 1999.

- HOEKZEMA R; VERHAGEN C; VAN HAREN M; KIJLSTRA A. Endotoxin-induced uveitis in the rat. the significance of intraocular interleukin-6. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 33: 532–539. 1992.
- JOHNSON RJ; COUSER WG; CHI EY; ADIER S; KLEBANOFF S. New mechanism for glomerular injury: myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-halide system. **J. Clin. Invest.** 79: 1379-1387. 1987.
- KEEBLE J E; BRAIN S D. A role for substance P in arthritis? **Neurosci. Lett.** 361: 176-179. 2004.
- KENNETH G J; OOI MSURG; GALATOWICZ G; CALDER VL; SUSAN L; LIGHTMAN SL. (FRCP, FRCOphth, FRCP eds.), *FmedSci. Cytokines and Chemokines in Uveitis-Is there a correlation with clinical phenotype?*, **Clinical Med. & res.** 04: 294-309 . 2006.
- KIRSCH R; WOODBURNE VE; SHEPHARD EG; KIRSCH RE. Patients with stable uncomplicated cirrhosis have normal neutrophil function. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 15: 1298-306. 2000.
- KLEBANOFF S; CLARK RA. The neutrophil: function and clinical disorders. **Amsterdam: Elsevier-North Holland.** 1978.
- KLEBANOFF S; CLARK RA; ROSEN H. Myeloperoxidase-mediated cytotoxicity. In: Schultz J, Ahmad F, eds. **Canc. Enzymol.**. New York: Academic Press. 276-288. 1976.
- LEVINE RL; GARLAND D; OLIVER CN; AMICI A; CLIMENT I; LENZ AG; AHN BW; SHALTIEL S; STADMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186: 464–478. 1990.

- LEVINE L; LUCCI JA; PAZDRAK B; CHENG JZ; GUO YS; TOWNSEND CM Jr et al. Bombesin stimulates nuclear factor κ B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. **Canc. Res.** 63: 3495-3502. 2003.
- MAHMOUD S; STALEY J; TAYLOR J; BODGEN A; MOREAU JP; COY D; AVIS I; CUTTITTA F; MULSHINE JL; MOODY TW. [Psi 13,14] bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer in vitro and in vivo. **Canc. Res.** 51: 1798-1802. 1991.
- MANTAS C; Direskeneli h; OZ D; YAVUZ S; Akoglu T. IL-8 producing cells in patients with behcet's disease. **Clin. Exp. Rheumatol.** 18: 249-251. 2000.
- MATTHEWS SB; HENDERSON AH; CAMPBELL AK. The adrenochrome pathway: the major route for adrenaline catabolism by polymorphonuclear leucocytes. **J. Moll. Cell. Cardiol.** 17: 339-348. 1985.
- MCDONALD TJ; NILSON G; VAGNE M; BLOOM SR; MUTT V. A gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. **Gut.** 19: 767-774. 1978.
- MEDINA S, DEL RIO M, VICTOR VM, HERNANZ A, DE LA FUENTE M. Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY. **Mech. Ageing. Dev.** 102: 249-261. 1998.
- MEDINA S, DEL RIO M, DE LA CUADRA B, GUAYERBAS N, DE LA FUENTE M. Age-related changes in the modulatory action of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystinin octapeptide in the proliferation of murine lymphocytes. **Neuropeptides.** 33: 173-179. 1999.
- MICHEL SS; FOSTER CF; Definition, classification, etiology, and epidemiology. In: Foster cs, Vitale AT. Diagnosis and treatment of uveitis. Philadelphia: **WB. Saunders.** 17-26. 2002.

- MINAMINO N; KANGAWA K; MATSUO H. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 114: 541. 1983.
- MISRA HP; FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** 247: 3170-3175. 1972.
- MOBERG G; LINDMARK G; MOBERG L; VENGE P. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. **Br. J. Haematol.** 55: 701-708. 1983.
- MOODY TW; CARNEY DN; CUTTITTA F; QUATTROCCHI K; MINNA JD. High affinity receptors for bombesin/GRP-like peptides on human small cell lung cancer. **Life Sci.** 37:105-113. 1985.
- MORIYAMA M; SATO T; INOUE H; FUKUYAMA S; TERANISHI H; KANGAWA K; KANO T; YOSHIMURA A; KOJIMA M. **J. Exp. Med.** 202- 217. 2005.
- NAKAMUTA M; OHASHI M; TANABE Y; HIROSHIGE K; NAWATA H. High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. **Hepatology** 18: 1377-1383. 1993.
- NISSALO S; HUKKANEN M; IMAI S; TORNWALL J; KONTTINEN Y T. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 966: 384. 2002.
- NUSSENBLATT RB. Proctor Lecture. Experimental autoimmune uveitis: mechanisms of disease and clinical therapeutic indications. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 32: 3131-3141. 1991.
- OKADA AA, SAKAI J, USUI M, MIZUGUCHI J. Intraocular cytokine quantification of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. **Ocul. Immunol. Inflamm.** 6: 111-120. 1998.

- OLIVEIRA PG; BRENOL CV; EDLWEISS MI; PETRONILHO F; ROESLER R; DAL-PIZZOL F; SCHWARTSMANN G; XAVIER RM. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Peptides** 29: 1726-1731. 2008.
- PARSLOW TG; STITES DP; TERR AI; IMBODEN JB. **Imunologia Médica** (tradução de Voeux PL. Guanabara Koogan eds), 10ª edição, Rio de Janeiro, pp 18-19, 652-655. 2004.
- PATEL O; SHULKES A; BALDWIN GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. **Biochim. Biophys. Acta.** 1766: 23-41. 2006.
- PETRONILHO F; ROESLER G; SCHWARTSMANN; DAL PIZZOL F. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. **Inflammation & Allergy- Drug Targets.** 061871-5281. 2007.
- PINSK J; SCHALLY AV; HALMOS G; SZEPESHAZI K; GROOT K; O'BYRNE K; CAI R-Z. Effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists on the growth of human small-cell and non-small-cell lung carcinomas in nude mice. **Br. J. Cancer** 70: 886-892. 1994.
- POULAKI V, ILIAKI E, MITSIADES N, MITSIADES CS, PAULUS YN, BULA DV, GRAGOUDAS ES, MILLER JW. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. **FASEB J.** 21: 2113-2123. 2007.
- POWIS G. Hepatic microsomal metabolism of epinephrine and adrenochrome by superoxide-dependent and -independent path-ways. **Biochem. Pharmacol.** 28: 83-89. 1979.
- QIN Y; ERTL T; CAI R-Z; HALMOS G; SCHALLY AV. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. **Cancer Res.** 54: 1035-1041. 1994.

- QIN Y; HALMOS G; CAI R-Z; SZOKE B; ERTL T; SCHALLY AV. Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 120: 519-528. 1994.
- RADULOVIC S; CAI R-Z; SERFOZO P; GROOT K; REDDING TW; PINSKI J; SCHALLY AV. Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal d- Trp or d-Tpi. **Int. J. Pept. Protein Res.** 38: 593-600. 1991.
- ROCKSEN D, LILLEHOOK B, LARSSON R, JOHANSSON T, BUCHT A. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and *N*-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. **Clin. Exp. Immunol.** 122: 249–256. 2000.
- ROITT I; BROSTOFF J; MALE D. **Imunologia** (tradução e revisão científica de Gubert IC, Malone eds), 6ª edição, São Paulo, pp 10-11. 2003.
- SAEED ZA; HUANG SC; COY DH; JIANG NY; HEINZ-ERIAN P; MANTEY S; GARDNER JD; JENSEN RT. Effect of substitutions in position 12 of bombesin on antagonist activity. **Peptides** 10: 597-603. 1989.
- SALVEMINI D; MAZZON E; DUGO L; RILEY DP; SERRIANO L; CAPUTI AP; et al. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. **Br. J. Pharmacol.** 132: 815–827. 2001.
- SCHWARTSMANN G; ROESLER R; DAL PIZZOL F; DA ROCHA A; POHLMANN; DI LEONE LUCIANE. Antagonistas de receptores do tipo bombesina/fator de liberação da gastrina como um novo alvo terapêutico nas neoplasias e outras enfermidades. **Prática Hospitalar** ano VII número 39 mai-jun. 2005.

- SUBRAMANIAM M, SUGIYAMA K, COY DH. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 168: 601-611. 2003.
- SUNDAY ME; KAPLAN LM; MOTOYAMA E, Biology of disease: gastrin releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. **Lab. Invest.** 59: 5-24. 1988.
- THEZE J. **The cytokine network and immune function** (Theze J, ed.). OxfordUniversity Press, New York, pp. 1. 1999.
- TRACEY KJ. Tumor necrosis factor. In: (Remick DG, Friedland JS, eds.) **Cytokines in health and disease.** New York, NY: Dekker. 1997.
- VAUGHAN D; ASBURY T; RIORDAN-EVA P. **Oftalmologia geral** (Atheneu ed.) 15.Ed.- São Paulo, p.142. 2003.
- VERMA MJ; LLOYD A; RAGER H; STRIETER R; KUNKEL S; TAUB D; WAKEFIELD D; Chemokines in acute anterior uveitis. **Curr. Eye. Res.** 16: 1202-1208. 1997.
- WANG LM; KITTERINGHAM N; MINESHITA S; WANG JZ; NOMURA Y; KOIKE Y; Miyashita E. The demonstration of serum interleukin-8 and superoxide dismutase in Adamantiades-Behcet's disease. **Arch. Dermatol. Res.** 298: 444-447. 1997.
- YADAV UC; SRIVASTAVA SK; RAMANA KV. Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 48: 4634-4642. 2007.
- YAGI K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Mol. Biol.** 108: 101-106. 1998.
- ZHOU J; CHEN J; MOKOTOFF M; Ball ED. Targeting gastrin-releasing peptide receptors for cancer treatment. **Anti-Canc. Drugs** 15: 921-927. 2004.

ZHANG XY; HAYASAKA S; HAYASAKA Y; CUI HA, CHI ZL. Effect of *N*-Acetylcysteine on Lipopolysaccharide-Induced Uveitis in Rats **Jpn. J. Ophthalmol.** 51: 14–20. 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)