

LÍVIA TEREZINHA PIMENTEL BRANCO

**INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DE MECANISMOS
NEUROGÊNICOS E OXIDATIVOS NO MODELO
EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia
do Instituto de Ciência Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia.**

Área de Concentração: Farmacologia

São Paulo

2008

LÍVIA TEREZINHA PIMENTEL BRANCO

**INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DE MECANISMOS
NEUROGÊNICOS E OXIDATIVOS NO MODELO
EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa.Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

São Paulo

2008

Aos meus pais e familiares pelo incentivo e apoio constante para a minha formação e educação.

Obrigada!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Farmacoregulação da Inflamação Neurogênica e Dor, Laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres, Laboratório de Fisiologia Celular e Laboratório de Laser em Medicina-Inflamação pelo inestimável auxílio e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos amigos e professores pela dedicação e incentivo, convívio e amizade.

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

“Todo homem, por natureza, quer saber.”

Aristóteles

RESUMO

BRANCO, L. T. P. **Investigação Farmacológica de Mecanismos Neurogênicos e Oxidativos no Modelo Experimental de Gastrosquise em Ratos**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

A gastrosquise (G) é o defeito congênito de fechamento da parede abdominal, o qual expõe o intestino do feto ao contato com o líquido amniótico, causando inflamação intestinal. Contudo, pouco se sabe sobre a relação desta doença com mecanismos neurogênicos e oxidativos. Avaliou-se neste estudo a expressão protéica e gênica de marcadores neurovasculares e oxidativos no intestino de fetos obtidos de mães tratadas (ou não) com o corticosteróide dexametasona (DMT). Estes foram divididos em três grupos: não manipulado (controle; C), falso operado (sham; S) e operado (G). A atividade da mieloperoxidase (MPO) aumentou significativamente no intestino do grupo G em relação ao C, mas não o S. A DMT não interferiu na atividade de MPO no grupo G, mas reduziu ($p < 0,001$) a atividade no grupo S. Enquanto a expressão gênica dos receptores NK_1 (preferencial para substância P), receptores VPAC1 e VPAC2 (preferencial para o peptídeo vasoativo intestinal; VIP) e TRPV1 no intestino do grupo G foi semelhante aos grupos C e S, a expressão RNAm dos receptores NK_2 (preferencial para neurocinina A) mostrou-se reduzida ($p < 0,01$) neste. Na vigência da DMT, a baixa expressão RNAm dos receptores NK_2 foi revertida no grupo G, mas a expressão gênica do receptor NK_1 foi aumentada. A expressão RNAm da óxido nítrico sintases neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) não foi distinta entre os grupos, mas a isoforma induzível iNOS aumentou ($p < 0,05$) no grupo G vs. S. Na vigência da DMT, a expressão RNAm das eNOS, nNOS e iNOS aumentou ($p < 0,05$) no grupo G em relação ao grupo não tratado. A expressão RNAm da ciclooxigenase (COX-2), mas não COX-1, revelou-se aumentada no grupo no G, a qual não foi modificada pela DMT. A análise de Western blot não demonstrou alterações significativas na expressão protéica da Superóxido Dismutase (SOD-1) ou 3-nitrotirosina (3-NT) no intestino de fetos com G. O tratamento com DMT aumentou a formação de 3-NT em relação ao grupo G não tratado. Maior concentração de interleucina 6 (IL-6), mas não do fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-1 β , foi detectada

($p < 0,05$) no intestino de fetos com G vs. C, mas não o S. Em conclusão, é provável que o processo inflamatório no intestino de fetos com G origina-se, pelo menos em parte, de uma combinação entre mecanismos oxidativos, geração de prostanóides via COX-2, IL-6 e fatores neurovasculares, que leva à disfunção intestinal, onde o tratamento com dexametasona não parece exercer efeito protetor evidente. Acredita-se que tais evidências podem ser utilizadas, alternativamente, como marcadores dessa condição inflamatória no homem, muito embora esta hipótese precisa ser investigada.

Palavras chave: gastrosquise; feto de rato; inflamação neurogênica; NO; estresse oxidativo; COX-2; dexametasona.

ABSTRACT

BRANCO, L. T. P. **Oxidative and Neurogenic Mechanisms of Bowel Inflammation in an Experimental Model of Gastroschisis.** 85 p. Thesis (Master in Pharmacology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008

Gastroschisis (G) is a congenital defect of the abdominal wall closure resulting in perivisceritis due to contact between the bowel and amniotic fluid. This study was undertaken to evaluate the involvement of neurovascular and oxidative mechanisms in this condition by analyzing the gene and proteic expressions of neurogenic and oxidative markers in the gut of foetus with G from female rats treated with dexamethasone or its vehicle saline. A marked increase of myeloperoxidase (MPO) activity was observed in the gut of foetus with G in comparison to control (C), but not sham (S), group. Groups with G exposed to dexamethasone exhibited the same MPO values as compared to CT. However, this treatment caused a significant reduction of MPO activity in sham-treated group (ST). The mRNA expression of NK₂ receptor (preferential for NKA) in both G and S groups was significantly reduced in the gut of these animals compared to C group. Neither NK₁ receptor (preferential for substance P) nor both vasoactive intestinal peptide receptors type 1 and 2 (VIP) and TRPV1 receptor mRNA expression was different between G and control groups (C and S). Treatment with dexamethasone reversed the reduced expression of NK₂ in the gut of foetus with GT and ST, but significantly increased the mRNA expression of NK₁ receptor. Increased mRNA expression of iNOS, but not nNOS and eNOS, was observed in G group when compared to S group. Dexamethasone treatment evoked a further increase in the mRNA expression of eNOS, nNOs and iNOS as compared to G group without treatment. The induction of G produced a significant increase in the mRNA expression of cyclooxygenase type 2 (COX-2), but not COX-1, and dexamethasone treatment did not interfere in these responses. Western blot analysis showed that neither SOD-1 nor protein nitration was different among groups with G and control. However, a significant increase of protein nitration was observed in G group treated with dexamethasone. Elevated concentrations of interleukin 6 (IL-6), but not TNF- α and IL-1 β , was found in the intestine of foetus with G when

compared to C group. The increase was not affected by dexamethasone. In conclusion, it is likely that the inflammatory process observed in the gut of foetus with gastroschisis arises through a combination of neurogenic mechanisms that act in concert with reactive oxygen species and possible generation of prostanoids via COX-2 to produce gut dysfunction. This data may have a major impact in developing strategies and markers to recognize gut impairment in the event of gastroschisis.

Key words: gastroschisis; rat foetus; neurogenic inflammation; nitric oxide; oxidative stress; COX-2; dexamethasone.

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

AIES	Antiinflamatórios esteroidais
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AP	Fosfatase alcalina
BK	Bradicinina
CAT	Catalase
CEEA-USP da Universidade de São Paulo	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEMIB Biológica	Centro Multidisciplinar para Investigação
C	Controle
CT	Controle com Corticóide
CDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase isoforma 1
COX-2	Ciclooxigenase isoforma 2
COX-3	Ciclooxigenase isoforma 3
DMT	Tratamento materno com dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dx	Dexametasona
ECN	Enterocolite necrosante
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GAPDH	Gliceraldeído Fosfato de desidrogenase
G	Gastrosquise
GCs	Glicocorticóides
GT	Gastrosquise com Corticóide
GPx	Glutathiona peroxidase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
HRP	Peroxidase de rabanete selvagem
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas

IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LA	Líquido amniótico
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NP-K	Variante da NKA
NK ₁	Receptor de taquicinina tipo 1
NK ₂	Receptor da taquicinina tipo 2
NK ₃	Receptor da taquicinina tipo 3
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NP- γ	Neuropeptídeo γ
3-NT	3-Nitrotirosina
PACAP pituitária	Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase
PAR-2	Receptor ativado por protease
PGs	Prostaglandinas
PLA	Fosfolipase A ₂
PMN	Polimorfonuclear
PPT-A	Preprotaquicinina A
PPT-B	Preprotaquicinina B
S	Sham
ST	Sham com Corticóide
SD	Sprague Dawley
SOD	Superóxido Dismutase
SOD-1	Superóxido Dismutase tipo 1
SP	Substância P
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR Reversa	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição

RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
VMAx/s	Velocidade máxima por segundo
VPAC1	Receptor tipo 1 do VIP
VPAC2	Receptor tipo 2 do VIP
TKs	Taquicininas
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRPV-1	Receptor Vanilóide tipo 1 com Potencial
Transitório	
TRPV-2	Receptor Vanilóide tipo 2 com Potencial
Transitório	
TRPV-3	Receptor Vanilóide tipo 3 com Potencial
Transitório	
TRPV-4	Receptor Vanilóide tipo 4 com Potencial
Transitório	
TRPV-5	Receptor Vanilóide tipo 5 com Potencial
Transitório	
TRPV-6	Receptor Vanilóide tipo 6 com Potencial
Transitório	
U	Unidade
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos <i>primers</i> utilizados.....	40
Tabela 2. Características do ciclo de amplificação dos <i>primers</i>	41
Tabela 3. Características dos anticorpos primários e secundários utilizados...43	
Tabela 4. Resumo de todos os resultados obtidos neste estudo.....	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Foto ilustrativa da cirurgia experimental da gastrosquise.....	35
Figura 2. Organograma do Experimento.....	37
Figura 3. A) Ensaio de Mieloperoxidase em amostras de intestinos de fetos de ratos Sham (S), Controle (C), com Gastrosquise (G); na ausência e presença do tratamento com dexametasona (CT), (ST) e (GT).....	47
Figura 4. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores de taquicinas NK ₁ (painel 4A) e NK ₂ (painel 4B) em intestino de fetos.....	49
Figura 5. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de VPAC1 (painel 5A) e VPAC2 (painel 5B) em intestino de fetos.....	50
Figura 6. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de TRPV1 em intestino de fetos.....	51
Figura 7. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) das diferentes isoformas do NO em intestino de fetos.....	53
Figura 8. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de COX-1 (painel A) e COX-2 (painel B) em intestino de fetos.....	55
Figura 9. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão protéica por Western Blot para SOD-1 em intestinos de fetos.....	57
Figura 10. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão de 3-NT em proteínas de amostras de intestinos de fetos por Western Blot.....	58
Figura 11 Concentração das citocinas TNF- α (Painel A), IL-1 β (Painel B) e IL-6 (Painel C) no intestino dos diferentes grupos experimentais.....	60

LISTA DE FÓRMULAS

FÓRMULA MOLECULAR	NOME QUÍMICO
HOCl^-	Ácido Hipocloroso
HNO_2	Ácido Nitroso
H_2O	Água
RO^\bullet	Alcoxila
HO^\bullet	Hidroxila
8-Metil-N-Vanilil-6 nonamida	Capsaicina
K^+	Potássio
NO_2^-	Nitritos
NO_3^-	Nitratos
NO	Óxido Nítrico
N_2O_3	Óxido Nitroso
O_2	Oxigênio
H_2O_2 hidrogênio	Peróxido de
ROO^\bullet	Peroxila
ONOO^-	Peroxinitritos
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superóxido
KH_2PO_4 potássio	Fosfato de

LISTA DAS PRINCIPAIS DROGAS E SUA PROCEDÊNCIA

DROGAS	PROCEDÊNCIA
Xilazina	Rompum [®] - Bayer do Brasil
Cetamina	Ketamina [®] - Pfizer do Brasil
Clorohexidina	Chlorohex [®]
Dexametasona Farmacêuticos S.A.	Decadron [®] - Aché Laboratórios
Brazol do Brasil	LGC Biotecnologia, Labtrade
Dihidrocloreto o-dianisidina	Sigma Chemical Co, EUA
HTAB	Sigma Chemical Co, EUA
Brometo de Etídio	GIBCO BRL, Life Technologies
Oligo dT	Invitrogen do Brasil
dNTP	Invitrogen do Brasil
DTT	Invitrogen do Brasil
MgCl ₂	Invitrogen do Brasil
Primers	Invitrogen do Brasil
Inibidor de RNAses	Invitrogen do Brasil
Taq polimerase	Fermentas do Brasil
Azul de Bromofenol	Merck, Germany
Mercaptoetanol	Sigma Chemical Co, EUA
Tris	Sigma Chemical Co, EUA
SDS	Sigma Chemical Co, EUA
Glicerol	Sigma Chemical Co, EUA
Ponceau	Sigma Chemical Co, EUA
Caseína	Sigma Chemical Co, EUA
BSA	Sigma Chemical Co, EUA
PMSF	Sigma Chemical Co, EUA
Anticorpos	BioRad, CALBIOCHEM, EUA
Citocinas	Sigma Chemical Co, EUA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Gastrosquise: evidências clínicas e experimentais	22
1.2 Processos oxidativo e neurovascular na inflamação	26
1.3 Resposta inflamatória intestinal na gastrosquise e mediadores relacionados	31
1.4 Justificativa do projeto e objetivos	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Animais e avaliação do Comitê de Ética e Experimentação Animal.....	33
2.2 Procedimento cirúrgico: gastrosquise experimental.....	33
2.3 Coleta de material	36
2.4 Organograma do experimento	37
2.5 Análise Bioquímica	37
2.5.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	37
2.5.2 Reação em cadeia de polimerase - transcrição reversa (RT-PCR)....	38
2.5.3 Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (3-NT) e SOD-1 via Western blot em homogenatos de intestino	41
2.5.4 Quantificação das citocinas TNF-α , IL-1β e IL-6.....	44
3 RESULTADOS.....	45
3.1 Avaliação da atividade da MPO em intestino de fetos com gastrosquise experimental.....	45
3.2 Avaliação da expressão gênica, por RT-PCR, para os receptores dos neuropeptídeos da família das taquicininas (NK₁ e NK₂), do VIP (VPAC1 e VPAC2) e TRPV-1 em intestinos de fetos com gastrosquise	47
3.3 Quantificação da expressão gênica das diferentes isoformas de NO sintases (NOs) em intestino de fetos com gastrosquise experimental.....	51
3.4 Quantificação da expressão gênica das isoformas de cicloxigenase em intestino de fetos com gastrosquise experimental.....	53

3.5 Análise da expressão de superóxido deismutase (SOD-1) e proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) por Western blot em intestino de fetos.....	55
3.6 Determinação das concentrações de citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6 no homogenato de intestino dos diferentes grupos experimentais	58
4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gastrosquise: evidências clínicas e experimentais

Aproximadamente há 500 anos, o cirurgião francês Ambroise Paré (1510-1590) descreveu, pela primeira vez, o defeito da parede abdominal anterior em fetos (PUTNAN et al., 1990). Posteriormente, Calder (1733) não deixou dúvidas ao relatar a ocorrência de herniação do intestino delgado em feto natimorto com anatomia umbilical normal (GRAY et al., 1972).

Em 1953, Moore designou a condição gastrosquise, termo de origem grega que significa “abdome fendido”. Por definição, constitui o defeito de fechamento da espessura total da parede abdominal, com herniação das alças intestinais na parte lateral direita do cordão umbilical (PUTNAN et al., 1990).

O fechamento das cavidades corporais do embrião ocorre via crescimento dos folhetos laterais, cranial e caudal, quando esse embrião possui aproximadamente dois milímetros de comprimento. Os ápices desses folhetos encontram-se no meio da parede abdominal anterior, e se fundem formando o umbigo (GRAY et al., 1972). A cavidade abdominal, durante a terceira e quarta semanas do desenvolvimento fetal, cresce rapidamente, enquanto o saco vitelino não muda de dimensões. Com isso, a ampla comunicação do intestino primitivo com o saco vitelino é reduzida paulatinamente, até que, na quinta semana, restringe-se apenas ao conduto ônfalo-mesentérico. Ocorre, então, um abrupto crescimento do intestino médio, desproporcional ao desenvolvimento da cavidade abdominal, causando a exteriorização de grande parte do intestino através do umbigo. Tal herniação fisiológica permanece até a décima semana, quando a cavidade abdominal já se desenvolveu suficientemente para acomodar o retorno do intestino. Deste momento até a décima segunda semana, ocorre o processo de rotação e fixação intestinal. A ausência do retorno do intestino à cavidade abdominal explica, em parte, a embriologia da gastrosquise.

Duhamel, em 1963, descreveu eventos críticos no fechamento da parede abdominal do embrião. O defeito relacionado ao fechamento do folheto

cranial causa as agenesias e deformidades da parede torácica e esterno. Quando o defeito acomete o folheto caudal, o feto poderá apresentar extrofia de bexiga ou cloaca. O não fechamento dos folhetos laterais pode resultar com hérnia umbilical, onfalocele ou gastrosquise.

Mais recentemente, uma nova hipótese foi sugerida para explicar a gênese do defeito da parede abdominal na gastrosquise. Analisando-se a angiogênese fetal, verificou-se que as artérias ônfalo-mesentéricas originam-se de plexos oriundos da aorta dorsal (HOYME et al., 1981). A artéria ônfalo-mesentérica esquerda desaparece mais precocemente, porém o ramo direito persiste no embrião. A porção proximal desse vaso dá origem à artéria mesentérica superior. A porção distal da artéria ônfalo-mesentérica direita hernia fisiologicamente, acompanhando o intestino através do umbigo na oitava semana. A ruptura da somatopleura pára-umbilical, ao nível da veia umbilical direita, durante tal migração, permitiria a herniação do intestino, agora livre no líquido amniótico (LA), (HOYME et al., 1981).

A incidência da gastrosquise têm uma variação de aproximadamente, 1-2 a 4-5 neonatos acometidos para cada 10.000 nascidos vivos (SANTIAGO-MUNOZ et al., 2007). Acredita-se que devido ao uso cada vez maior de tabaco e drogas de abuso durante a gestação, a incidência de gastrosquise tem aumentado nos últimos dez anos em alguns países, tais como na Finlândia e Reino Unido (SUITA et al., 2000; TAN et al., 2008). Além disso, segundo Torfs et al. (1998) e Lam et al. (2006), o desenvolvimento da gastrosquise está correlacionado à falta de proteína animal, vegetais e frutas na dieta da mulher, gerando uma deficiência nos níveis de substâncias antioxidantes como o α -caroteno e glutatona.

Vários são os fatores pré-natais que parecem influenciar na evolução clínica dos neonatos com gastrosquise. Entre eles destacam-se a idade materna, mães jovens com idade até 25 anos, a via do parto, idade gestacional do aparecimento do defeito no feto, presença de estresse fetal e o tipo de correção cirúrgica pós-natal (CRAWFORD et al., 1992; SIMMONS et al., 1996; DUNN et al., 1999; MOORE et al., 1999; TAN et al., 2008). O aumento da espessura das alças intestinais, diminuição do fluxo sanguíneo intestinal das alças expostas detectadas pelo ultrassom Doppler e presença de atresias associadas são achados relacionados a uma pior evolução neonatal (ADRA et

al., 1996; ABUHAMAD et al., 1997; DEANS et al., 1999; FLEET et al., 2000).

Em geral, os portadores de gastrosquise são prematuros e possuem baixo peso ao nascer (média de 2.700 g); (CURRY et al., 2000; LAUSMAN et al., 2007). No passado, esses pacientes apresentavam baixas taxas de sobrevivência, devido à inexistência de recursos de terapia intensiva neonatal e à precariedade das técnicas cirúrgicas empregadas em sua correção. Em países desenvolvidos, estima-se que a mortalidade dos neonatos portadores dessa patologia é de cerca de 10%, estando mais relacionada à presença de atresia intestinal e enterocolite necrosante, mas em países em subdesenvolvidos ou em desenvolvimento pode chegar até 45% (RINEHART et al., 1999; SNYDER, 1999).

Na gastrosquise, a associação de anomalias cromossômicas é baixa, sendo que outros fatores ambientais, como o uso do tabaco, dieta alimentar e incluindo o uso de certas medicações, como pseudoefedrina associada ao paracetamol, paracetamol e aspirina, parecem interferir mais em sua gênese. Apesar da relativa baixa mortalidade, 45% dos casos dos portadores de gastrosquise apresentam complicações. A alta morbidade está relacionada, principalmente, ao lento retorno da motilidade intestinal, que predispõe à translocação bacteriana e sepse (BLAKELOCK et al., 1997; TORFS et al., 1998; WERLER et al., 2002; LAM et al., 2006). Além disso, a necessidade de repetidas cirurgias e o tempo prolongado de internação hospitalar agravam o quadro, colaborando com o aumento das taxas globais de morbidade (BLAKELOCK et al., 1997; SKARGARDS et al., 2008).

Nas últimas décadas, a chance de sobrevivência dos neonatos portadores de gastrosquise vem aumentando devido a três fatores: 1) criação de unidades de terapia intensiva neonatal; 2) desenvolvimento de avanços em nutrição parenteral e; 3) utilização de novas drogas anestésicas que possibilitaram uma melhor estabilidade hemodinâmica e respiratória durante o ato cirúrgico (DRIVER et al., 2000).

Há aproximadamente 40 anos, Allen et al. (1969) idealizaram a utilização de prótese de silicone em formato cilíndrico (silo), que seria ordenhada progressivamente, direcionando o conteúdo intestinal de volta à cavidade abdominal. Posteriormente, o tratamento preconizado, utilizado ainda atualmente para os neonatos com gastrosquise, é o fechamento primário do

defeito, imediatamente após o parto (CANTY et al., 1983; SKARGARDS et al., 2008). No entanto, existem casos onde o volume das alças intestinais é muito superior à cavidade abdominal. Conseqüentemente, o fechamento primário não é indicado, pois acarreta grandes transtornos respiratórios e hemodinâmicos (LACEY et al., 1993).

Evidências mostram que a exposição das alças ao LA promove alterações funcionais, histológicas e bioquímicas na parede intestinal de fetos com gastrosquise, as quais são as principais causas da morbidade e mortalidade neonatal (BEALER et al., 1996). Segundo alguns autores, tais alterações intestinais são resultantes do processo inflamatório iniciado intra-útero (LANGER et al., 1989; DILSIZ et al., 1999). Macroscopicamente, o intestino exposto apresenta-se espessado, dilatado, e recoberto por camadas de fibrina. Funcionalmente, as alças apresentam diminuição da contratilidade, da atividade enzimática das vilosidades e alterações na síntese de colágeno na região submucosa (SRINATAN et al., 1995).

Na tentativa de melhor compreensão da fisiopatologia da gastrosquise, alguns modelos experimentais em fetos de galinhas (AKTUG et al., 1998), de ovelhas (LANGER, et al., 1990), de coelhas (PHILLIPS et al., 1991; ALBERT et al., 2001) e, mais recentemente, de ratas (CORREIA PINTO et al., 2001), têm sido desenvolvidos. De forma geral, nos modelos experimentais, o defeito é criado no final da gestação, aos 18,5 dias de gestação. Já em humanos, a gastrosquise ocorre ao redor da décima semana de gestação, quando a herniação fisiológica do intestino deve desaparecer.

Langer et al. (1989), na tentativa experimental de explicar a lesão intestinal na gastrosquise, sugeriram que a compressão exercida pelo orifício da parede abdominal sobre o mesentério é um fator importante na gênese da lesão intestinal. Entretanto, outros estudos mostraram que a criação de defeitos de parede abdominal com diferentes dimensões de orifícios não altera as lesões do intestino extruso (ALBERT et al., 2001). Em estudos subseqüentes, ficou comprovado que o contato com o LA é o principal fator causal do processo inflamatório intestinal, ao invés da compressão exercida pelo orifício da parede abdominal (ALBERT et al., 1993, 2001, 2003; GUO et al., 1995; CORREIA-PINTO et al., 2001, 2002).

As alterações morfológicas intestinais na gastrosquise ocorrem,

principalmente, no último trimestre de gestação (LANGER et al., 1989; SHAW et al., 1994). Segundo Tibboel et al. (1986), não foi observada serosite na gastrosquise humana antes da trigésima semana de gestação. No último trimestre, o LA humano sofre modificações em sua composição relacionadas à maturação da função renal fetal. Níveis de uréia, creatinina e mecônio aumentam, enquanto a osmolaridade e os níveis de sódio diminuem. Experimentos em ratos e coelhos sugerem que a presença de mecônio no LA tem relação positiva com a inflamação intestinal, enquanto que a urina não foi capaz de desencadear tal lesão (CORREIA-PINTO et al., 2002; ALBERT et al., 2003). Por conta dessas alterações teciduais locais, o intestino fica mais susceptível à ocorrência de fenômenos de translocação bacteriana, íleo paralítico e desenvolvimento de enterocolite necrosante (MORRISON et al., 1998; GOMEZ et al., 1998).

1.2 Processos oxidativo e neurovascular na inflamação

Paralelamente, nas últimas duas décadas, vários estudos vêm explorando novos tratamentos para melhor compreensão da resposta inflamatória aguda ou crônica, incluindo a participação de componentes neurovasculares e oxidativos.

As moléculas que geralmente contêm de um a quatro átomos juntamente com uma molécula de oxigênio ou nitrogênio em sua estrutura são designadas de espécies reativas. Algumas são (ou formam) radicais livres, átomos individuais ou grupos de átomos com um ou mais pares de elétrons não pareados. Esses radicais possuem cargas (- ou +), embora alguns sejam isentos de cargas e apresentam reatividade variada. O óxido nítrico (NO) é bem menos reativo do que o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

As principais espécies reativas de oxigênio distribuem-se em dois grupos: os radicalares, como a hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$), e os não-radicalares oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as espécies reativas de

nitrogênio, incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas.

No processo inflamatório, dentre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) relevantes, destaca-se o NO, o qual é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, convertido em L-citrulina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta existe em três isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS) (Moncada, 1992). As isoformas eNOS e nNOS são importantes fisiologicamente por manterem a resposta homeostática, enquanto a iNOS pode ser induzível frente à geração de citocinas durante um processo patológico (MILJKOVIC et al., 2004).

Por se tratar de um gás, o NO se difunde rapidamente através de membranas celulares (IGNARRO et al., 1987), onde pode exercer vários papéis fisiológicos, incluindo o seqüestro de radicais superóxidos O₂⁻, (RUBANYI e VANHOUTTE, 1986). Por outro lado, em concentrações elevadas, o NO é citotóxico, contribuindo para a lesão celular em situações de choque hipovolêmico e endotóxico (NAVA et al., 1991). O NO também reage rapidamente com o O₂⁻, formando um potente agente oxidante: o ONOO⁻, que é mais reativo que os seus precursores, e mais tóxico para as células que o H₂O₂, O₂⁻ e NO.

O envolvimento de espécies reativas na resposta inflamatória tem sido amplamente demonstrado na literatura. As espécies reativas são geradas continuamente no organismo vivo. Em geral, alguns possuem um papel fisiológico importante, enquanto outros são gerados por células ou produtos de metabolismo e estão mais envolvidos em situações patológicas (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Além da importância dessas substâncias no mecanismo de defesa do organismo e lesão tissular durante o processo inflamatório, as espécies reativas estão envolvidas em eventos mais elaborados da deflagração da resposta inflamatória, como a dinâmica da resposta vascular e o influxo de leucócitos (RAMIREZ-PRIETO et al., 2006). Ainda, sabe-se que no organismo, algumas dessas moléculas encontram-se envolvidas na produção de energia,

fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica de membrana e agressão às proteínas de tecidos e membranas, enzimas, carboidratos e DNA. Desta forma, encontram-se relacionados com várias situações patológicas tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer, ou pode ser o fator agravante do quadro geral (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). O aumento, desequilíbrio das ROS/RNS no organismo é combatido por substâncias antioxidantes produzidas pelo próprio organismo ou provindas da dieta. O agente antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2007). Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione-peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) ou não-enzimaticamente, a exemplo de glutathione reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e coenzima Q reduzida (CoQH₂). Dentre os principais antioxidantes provenientes da dieta, destacam-se o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos como os flavonóides e poliflavonóides.

Paralelamente, está bem estabelecido que na vigência de estímulos nocivos adequados, as fibras sensoriais são estimuladas e uma variedade de neuropeptídeos é liberada de suas terminações nervosas, desencadeando o fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. Esta compreende alterações vasculares e celulares, tais como vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular (edema) e influxo de leucócitos (BRAIN, 1997).

De modo geral, qualquer dano tecidual pode desencadear uma resposta inflamatória neurogênica ou não. Na pele, os eventos capazes de ativar nervos sensoriais incluem: 1) estímulos diretos: calor, isquemia, eventos mecânicos, aumento da concentração de K⁺ por lise celular, baixo pH e estimulação elétrica, picadas de insetos ou injeção intradérmica de venenos de aranha; 2) mediadores inflamatórios: liberados no local ou trazidos à pele pela circulação sistêmica (ex.: bradicinina [BK]), (COSTA et al., 1997).

A estimulação das fibras sensoriais por mediadores químicos endógenos ou exógenos é modulada por receptores e canais iônicos específicos distribuídos ao longo do axônio e no corpo celular (BENHAM et al., 2003). Dentre esses, destacam-se os receptores vanilóide tipo 1 com potencial transitório (TRPV1); (CATERINA et al., 1997; LEE et al., 2003), de BK (BERGREN, 2006), de histamina (LEE e WIDDICOMBE, 2001), de 5-HT₄ (COSTA et al., 2003) e receptor ativado por protease-2 (PAR-2); (DING-PFENNIGDORFF et al., 2004).

Pelo menos quatro membros da família de receptores TRPV já foram identificados e clonados (TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 e TRPV5/6; GUNTHORPE et al., 2002; CLAPHAM et al., 2003). Os receptores TRPV1 são sabidamente ativados por estímulos exógenos como a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6 nonamida), ingrediente pungente extraído de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* (CATERINA et al., 1997) ou possivelmente por estímulos endógenos, tal como os endocanabinóides (ROSS, 2003).

Com relação à estrutura e função, os receptores TRPV1 pertencem à família dos receptores com potencial transitório (transient receptor potential vanilloid). Por se tratar de canais catiônicos não seletivos e termosensíveis, esses receptores podem ser também estimulados por prótons extracelulares, baixo pH (pH 5,4), temperatura (a 37°C) e alguns mediadores endógenos (anandamida, eicosanóides, (S)-HETE, 5-S-HETE); (BENHAM et al., 2003).

Dentre os principais neuropeptídeos envolvidos na inflamação neurogênica, destacam-se as taquicininas SP, neurocinina A e B (NKA, NKB). As taquicininas compõem uma família de peptídeos que possuem uma seqüência C-terminal Fe-X-Gli-Leu-MetNH₂. Esses foram assim denominados por produzirem rápida contração de vísceras animais, em oposição à BK, um peptídeo de origem plasmática, que provoca contração intestinal de desenvolvimento lento. Em mamíferos, o gene pré-pro-taquicininina A (PPT-A) codifica, por *splicing* (processo que remove os *íntrons* e junta os *éxons* durante a transcrição do RNA) diferencial, os peptídeos SP, a NKA e suas variantes NP-K e NP- \square . Um gene distinto, o pré-pro-taquicininina B (PPT-B) codifica somente a síntese da NKB (SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997).

Até o presente momento, três receptores denominados NK-1, NK-2 e NK-3, todos acoplados à proteína G, foram descritos para as taquicininas.

Cada um com distribuição variada entre tecidos e tipos celulares. As taquicininas interagem com os três receptores, porém com afinidades, mecanismos de sensibilização e dessensibilização distintos (SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997).

A SP, o principal membro da família das taquicininas e mais importante na microcirculação, é um peptídeo formado por 11 resíduos de aminoácidos (SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997). Está freqüentemente presente em um mesmo neurônio com o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e, em geral, são co-liberados mediante estímulos adequados (WALLENGREN et al., 1987). A SP é um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos, sendo 100 vezes superior à histamina em idênticas concentrações molares (FOREMAN, 1987).

Em adição às taquicininas, o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), formado por 28 resíduos de aminoácidos, encontra-se amplamente distribuído na pele bem como no sistema nervoso entérico (CHORNY et al., 2006). Pertence à família na qual também se encontram, a secretina, glucagon, gastrina, polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP) e o peptídeo inibidor gástrico.

O VIP tem sido descrito como importante modulador de funções imunológicas em diversas células imunocompetentes via ativação de seus receptores específicos VPAC1 e VPAC2 (CHORNY et al., 2006). Evidências emergentes apontam esse peptídeo como um fator antiinflamatório potente, que regula a produção de mediadores antiinflamatórios e pró-inflamatórios (CHORNY et al., 2006). Dessa forma, o VIP atua como um candidato promissor, alternativamente aos demais agentes, na fisiopatologia de doenças inflamatórias aguda, crônica e autoimune, incluindo o choque séptico, artrite reumatóide, esclerose múltipla e a doença de Crohn.

Além da co-localização com as taquicininas e os demais neuropeptídeos em fibras nervosas sensoriais, o VIP foi encontrado no suor e também co-localizado com a acetilcolina em fibras parassimpáticas pós-ganglionares. A liberação desse peptídeo e da acetilcolina ocorre de maneira independente, mas; em geral, condicionada à freqüência de estimulação da fibra nervosa. Células como os mastócitos, leucócitos polimorfonucleares (PMN) e eosinófilos são também fontes de VIP. Ambos, VIP e PACAP, interagem com afinidade

variável em receptores comuns, tanto na pele quanto em outros sistemas (GASPARI, 2003).

1.3 Resposta inflamatória intestinal na gastrosquise e mediadores relacionados

A prevenção ou redução da lesão inflamatória intestinal constitui um dos alvos na pesquisa do tratamento da gastrosquise. Contudo, a literatura ainda é escassa e pouco tem sido esclarecido sobre os eventos iniciais, agentes causais e mediadores da resposta inflamatória intestinal nessa condição.

Embora ainda não se tenha estabelecido uma terapia efetiva para o tratamento da lesão inflamatória intestinal na gastrosquise, sabe-se que a administração experimental de antiinflamatórios esteróides demonstrou, além das ações antiinflamatórias, efeitos favoráveis sobre o desenvolvimento pulmonar e intestinal fetal (JOBÉ et al., 2004; YU et al., 2004).

Classicamente, a enzima cicloxigenase (COX), oxida lipídios (ácido araquidônico; AA) presentes nas membranas das células, dando origem aos mediadores endógenos, conhecidos como eicosanóides, responsáveis por vários eventos fisiológicos e, alguns, patológicos (DAMNHART, et al., 2000). A conversão do AA pela ação enzimática da COX ocorre mediante a ação de duas isoformas: COX-1, COX-2, muito embora uma variante da COX-1, denominada COX-3 foi também sugerida (WEINBERG, 2000; CHANDRASEKHARAN et al., 2002). A COX1, presente em quase todos os tecidos é responsável pela produção de prostanóides, os quais dentre outras funções protegem o estômago e o rim contra lesões. Em geral, a COX-2 é uma forma induzível mediante estímulo inflamatório (ex. citocinas) ou em resposta às lesões teciduais e infecções. Entretanto, a expressão dessa enzima foi observada em tecido ou órgãos normais.

Os agentes antiinflamatórios esteróides (AIES; glicocorticóides), cujos mecanismos consistem na estimulação da produção de lipocortinas (anexinas), que bloqueiam a fosfolipase A₂ (PLA) e os não-esteróides (AINES; aspirina, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno e piroxicam), cujo mecanismo consiste

na inibição da enzima COX (MORAND, 2007), estão entre os fármacos mais utilizados para o alívio da dor e inflamação, em geral. Entretanto, devido aos efeitos adversos associados aos AINES e AIES, o uso desses fármacos é restrito a períodos curtos.

1.4 Justificativa do projeto e objetivos

Embora conexões existam entre a resposta inflamatória intestinal desenvolvida na gastrosquise e mecanismos modulados por eicosanóides, não existem evidências farmacológicas ou bioquímicas sobre a correlação entre processos neurovasculares e oxidativos na gastrosquise experimental em ratos ou humanos.

Diante da escassez destas informações, este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar, por meio de testes bioquímicos, a participação de mecanismos neurogênicos e oxidativos no intestino de fetos de ratos Sprague Dawley (SD) com gastrosquise experimental;
2. Investigar a capacidade do tratamento agudo com dexametasona afetar o processo inflamatório e os mecanismos relacionados na gastrosquise experimental em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e avaliação do Comitê de Ética e Experimentação Animal

Ratas da linhagem Sprague Dawley (SD; 250 g), e sua prole de ambos os sexos, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Quando prenhas as ratas foram alojadas individualmente em gaiolas metabólicas com ração e água *ad libitum*.

O presente projeto foi submetido e aprovado pelas Comissões de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade de São Paulo (CEEA-USP).

2.2 Procedimento cirúrgico: gastrosquise experimental

Os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados às 3^a feiras, no período da manhã, no laboratório de Cirurgia Fetal Experimental. A coleta de dados foi realizada após 21,5 dias de gestação, às 6^a feiras, também pela manhã.

As ratas foram submetidas ao acasalamento no CEMIB, e a possível presença da mancha vaginal foi sempre avaliada no dia subsequente do acasalamento, configurando o sucesso do acasalamento. Essa data foi considerada o dia zero de gravidez (tempo de gestação normal de ratas até o termo é de aproximadamente 22 dias).

Aos 18,5 dias de gestação, as ratas prenhas foram submetidas ao procedimento cirúrgico para indução da gastrosquise, mediante anestesia com a injeção intramuscular (i.m.) de 0,6 ml da mistura de xilazina e cetamina (50:10 mg/ml), na musculatura lateral da coxa (i.m.), com o auxílio da seringa e

agulha de insulina (20G). A seguir, o animal foi colocado sobre a bancada com manta de aquecimento (37 °C; *Harvard Apparatus*) e o seu abdome foi depilado, com o cuidado para não ferir os mamilos.

Após assepsia do abdome com a solução aquosa de clorohexidina (Chlorohex[®]) e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritônio) e os fetos foram cuidadosamente removidos do útero. Os fetos foram quantificados a partir da porção proximal para a porção distal em relação ao colo uterino, iniciando-se a contagem pelo corno direito. O primeiro e o último feto de cada corno não foram utilizados no experimento, pelo risco de indução de abortamento. O segundo feto, contado a partir do istmo uterino direito, foi considerado o primeiro feto da numeração, o qual foi submetido à gastrosquise experimental. O feto seguinte foi sempre controle, sem nenhuma manipulação, e o subsequente, foi considerado um animal sham, com manipulação de falsa cirurgia, onde esse foi somente retirado da cavidade uterina e recolocado sem sofrer nenhuma manipulação cirúrgica. Tal seqüência foi sucessivamente repetida, do corno direito para o corno esquerdo.

Para os fetos submetidos à gastrosquise experimental e ao procedimento sham, foi realizada uma sutura em bolsa (fio Prolene[®] 6-0) na parede uterina. Em seguida, o útero foi aberto em suas duas camadas, muscular e membrana amniótica. Para o feto da gastrosquise experimental, ele foi exposto pela incisão uterina até a altura da inserção do cordão umbilical e mantido com o abdome superior e o tórax no interior do útero materno. Parte do membro inferior direito e do membro inferior esquerdo, do feto foi exposto, a fim de facilitar a exposição da região abdominal a ser incisada. A porção exposta do feto foi sempre mantida aquecida com o gotejamento de solução fisiológica na temperatura de 38 °C.

Para a realização da gastrosquise, uma incisão de laparotomia para-umbilical direita, com extensão padronizada de 5 mm, foi feita na cavidade abdominal fetal, com o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado (Figura 1). As alças intestinais foram expostas com facilidade pela compressão delicada do abdome fetal com hastes de algodão esterilizadas (cotonetes[®] - *Johnson & Johnson* do Brasil). Após a realização da gastrosquise, o feto foi cuidadosamente recolocado na cavidade uterina e o útero foi fechado pela

sutura em bolsa, previamente realizada. Antes do fechamento da bolsa, um volume de 0,5 ml de solução fisiológica estéril aquecida foi colocado no interior da cavidade uterina. O feto seguinte, controle, não foi submetido à cirurgia e tampouco retirado do útero. O feto subsequente, *sham*, foi removido da cavidade uterina até a altura da inserção do cordão umbilical e submetido a uma gentil compressão do flanco direito, com o auxílio de hastes flexíveis de algodão, e então recolocado na cavidade uterina.

Ao final do procedimento nos fetos disponíveis, a parede abdominal da rata mãe foi fechada (fio mononylon 2-0 sutura contínua) em dois planos, e o período pós-operatório se deu nas gaiolas metabólicas, em baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

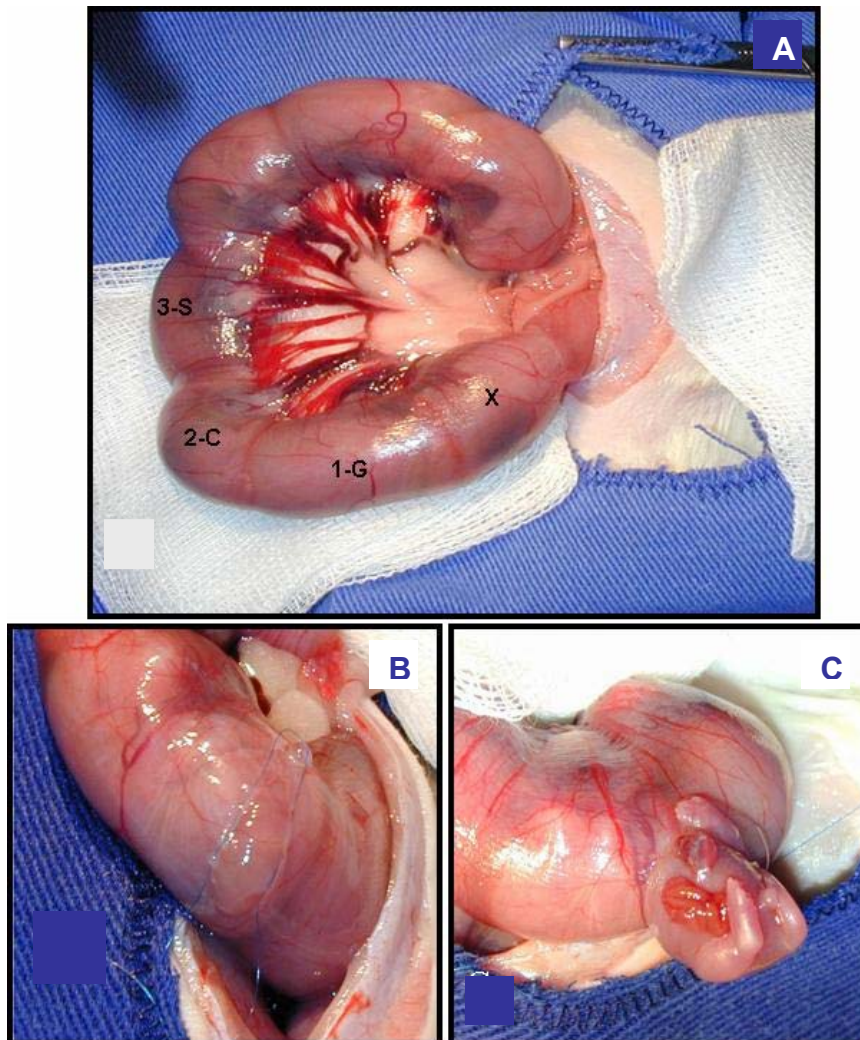


Figura 1. Foto ilustrativa da cirurgia experimental da gastrosquise: (A) exposição do corno uterino direito e seqüência da classificação fetal (C= Controle, S= Sham, G=Gastrosquise); (B) abertura da cavidade uterina e (C) indução da gastrosquise experimental.

Em experimentos, alguns fetos foram submetidos ao procedimento cirúrgico na presença do tratamento materno com dexametasona (instilação local na cavidade peritoneal; 0,25 mg/kg i.p.), cuja dose foi definida com base na literatura, onde foram relatados resultados positivos na maturação intestinal e pulmonar dos fetos (Buchmiller et al., 1994; Guarino et al., 2000), logo após esses serem recolocados à cavidade uterina.

Ao longo deste estudo, os fetos foram divididos em grupos experimentais da seguinte forma: gastrosquise experimental (G), controle (C), sham (falso-operado, S). A mesma divisão foi adotada para fetos obtidos de matrizes submetidas ao tratamento com dexametasona (CT, ST e GT), totalizando seis grupos experimentais.

2.3 Coleta de material

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram novamente anestesiadas com xilazina e cetamina e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. Os fetos previamente operados e seus controles foram removidos do útero, sacrificados por injeção letal do anestésico e punção occipital. Com o auxílio de microscopia e sob foco de luz, o abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado, expondo-se alças intestinais. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal.

Imediatamente, amostras de intestino foram removidas dos fetos e parte destas dispostas em Brazol[®] (LGC Biotecnologia) e outras não, e reservadas em freezer – 80 °C, para posteriores análises bioquímicas.

2.4 Organograma do experimento

Abaixo, encontra-se um resumo do procedimento experimental e protocolos realizados subsequente à indução da gastrosquise.

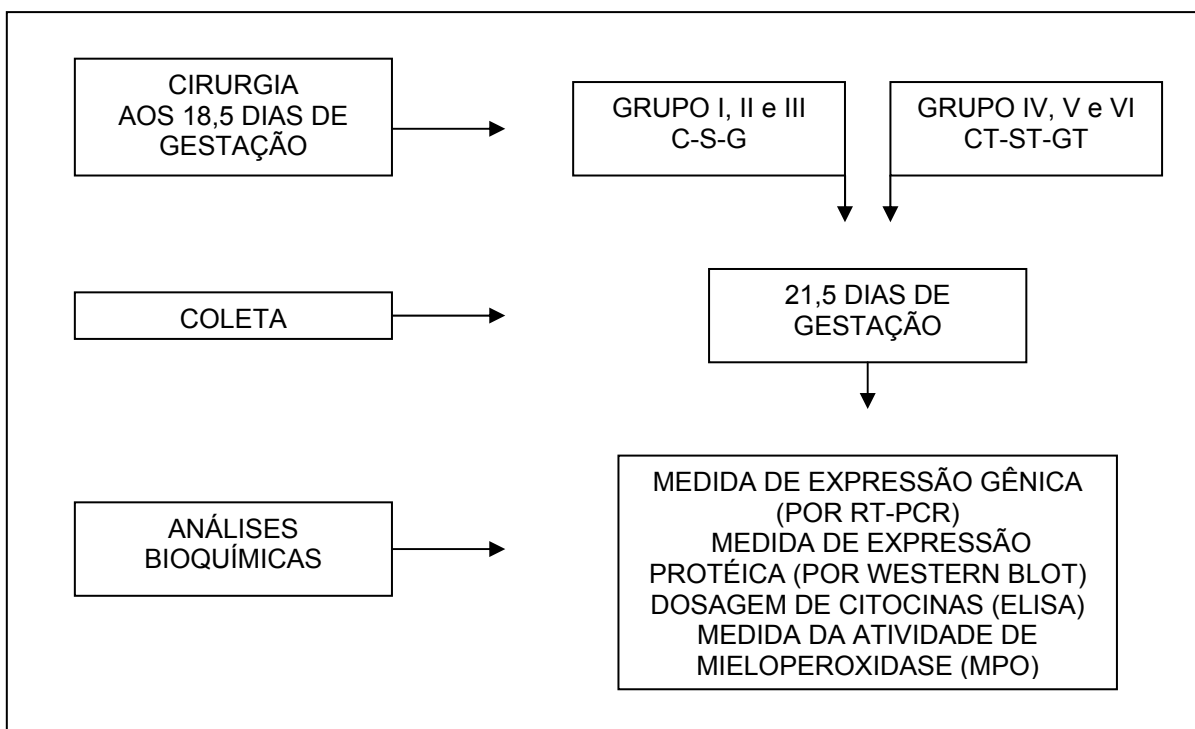


Figura 2. Organograma do Experimento.

2.5 Análise Bioquímica

2.5.1 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato \square -dianisidina na presença de H_2O_2 , e evidenciada pela mudança de absorvância medida em comprimento de onda de 460 nm (BRADLEY et al., 1982)

As amostras de intestino e fígado (75 - 95 mg) coletadas foram homogeneizadas (durante 15 seg); (homogeneizador Politrón, Brinckman) em

tampão KH_2PO_4 (50 mM, pH 6,0) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5%); na razão de 1 ml/50 mg de tecido com o auxílio do homogenizador (Politron, Brinckman) durante 15 s. Os homogenatos obtidos foram subsequentemente incubados em estufa (60 °C, durante 2 h) para inativação da catalase e depois centrifugadas (12,000 rpm, 15 min). Os sobrenadantes (20 μl de cada amostra) foram coletados e incubados em microplaca juntamente com 200 μl da solução de tampão KH_2PO_4 contendo dihidrocloreto de o-dianisidina (0,164 mg/ml) em H_2O_2 (0,0005 %, pH 6,0).

A análise da densidade ótica (460 nm) foi realizada em leitor de ELISA (intervalos de 10 s, durante 10 min). A atividade da MPO foi expressa em unidades e corrigida pelo peso da amostra (g) segundo a fórmula: $\text{MPO (U/g)} = \text{Vmax/s} \times 60/0,0113/0,5$. Considerou-se que uma unidade de atividade de MPO corresponde àquela capaz de degradar 1 μmol de H_2O_2 por minuto (BRADLEY et al., 1982).

2.5.2 Reação em cadeia de polimerase - transcrição reversa (RT-PCR)

Extração do RNA total: a expressão de mRNA em amostras do intestino foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). As amostras foram homogeneizadas (Brazol (10 ml/g de amostra, LABTRADE do Brasil) e o RNA total foi extraído. Após 5 min, para cada 5 ml de Brazol foi adicionado, sob agitação, 1 ml álcool isoamílico e clorofórmio (proporção 1:24). As amostras foram reservadas (10 min) e posteriormente centrifugados a 12.000 g, 15 min a 4 °C (Centrífuga Eppendorf modelo 5810 (Eppendorf, Califórnia, EUA). O volume de 600 μL de sobrenadante foi coletado e o RNA precipitado pela adição de 500 μl de isopropanol. Após 10 min, as amostras foram centrifugadas (12.000 g, 10 min a 4 °C) e os sobrenadantes foram descartados. O *pellet* contendo o RNA foi ressuspensão em etanol 95% (500 μl) e após nova centrifugação (7.000 g, 5 min a 4 °C), o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi novamente ressuspensão em etanol 75% e finalmente centrifugados (7.000 g, 5 min a 4 °C). O RNA obtido foi dissolvido em 50-100 μl de água tratada com pirocarbonato dietil (DEPC). Alíquotas desta solução foram diluídas (1:500) e submetidas à leitura de

absorbância (260 nm) em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro; Amersham Bioscience, Inglaterra). A concentração de RNA total foi calculada em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e a integridade deste, foi verificado por eletroforese em gel de agarose (1% em TAE contendo 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA) e as bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

Transcrição do cDNA: a solução contendo água (23 μl ; tratada com DEPC), oligo dT (5 μg) foi aquecida (70 °C; 10 min) e reservada (23 °C; 10min). A seguir foram adicionados à solução volumes de tampão de reação (10 μl ; Invitrogen do Brasil), dNTP (2,5 μl ; Invitrogen do Brasil), DTT (5 μl ; 0,1 M, Invitrogen do Brasil) e o inibidor de RNAses (1 μl ; Invitrogen do Brasil). Esta mistura foi aquecida (37 °C, 2 min) e novamente submetida ao aquecimento (37 °C) por 1h. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 70 °C durante, durante 15 min, e depois a 37 °C, por 2 min, quando então foram mantidas em freezer (-20 °C) até o processamento do PCR.

PCR: os primers foram preparados em água Milli-Q autoclavada como solução estoque inicial na concentração de 500 pmoles/ μl . As seqüências de nucleotídeos dos primers e seus números de pares de bases (bp) estão descritos na Tabela 1.

Para a reação da polimerase (PCR) foi preparada uma solução contendo o cDNA da amostra (2,5 μl), tampão para PCR (2,5 μl ; 10X), MgCl_2 (0,75 μl ; 1,5 mM), dNTPs (0,5 μl ; 0,2 mM), primer 3' e 5' (1,5 μl ; 0,3 μM), Taq polimerase (0,25 μl ; 1,25 U, Fermentas, Brasil) e H_2O Milli-Q autoclavada (q.s.p. 18,5 μl) . O Gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno (1,5 μl de primer 3' 0,3 μM e 1,5 μl de primer 5' 0,3 μM). Após o processo de desnaturação inicial (94 °C, 5 min), foi iniciado o ciclo de amplificação, cuja característica (número de ciclos, temperatura e tempo das etapas de desnaturação, anelamento e extensão) para cada produto de PCR (RNAm) está descrita na Tabela 2. Após a última etapa de extensão do ciclo de amplificação, seguiu o ciclo de extensão final (72 °C por 10 min e a 4 °C por 15 min).

Separação dos produtos de PCR: alíquotas de 10 μl dos produtos da

reação do PCR (amostras) foram aplicadas ao gel de agarose (1,5%, contendo de brometo de etídeo 0,5 µg/m) e foram visualizados sob luz UV. As imagens foram capturadas, pelo detector de imagens (Chemilmager 5500, Alpha-Inotech Corp., EUA).

As intensidades das bandas foram determinadas por densitometria, usando programa específico. O nível da expressão foi expresso em % (grupo Sham considerado 100%), onde a razão entre a intensidade da expressão de mRNA para os primers analisados pela intensidade da expressão de mRNA do controle interno (GAPDH).

Tabela 1: Características dos *primers* utilizados e referências

Primer	Seqüências (5'→ 3')	Referência e	Produto (bp)
nNOS	FW 5'-CCCCGTCCTTTGAATACCAG-3' RW 5'-CCGAGAGCCGAGGCCGAACA-3'	Swain et al.. (1997)	560
iNOS	FW5'-ACAACAGGAACCTACCAGCTCA-3' FW 5'-GATGTTGTAGCGCTGTGTGTC-3'	Ferraz et al.(1997)	651
eNOS	FW 5'-GGAGAAGATGCCAAGGCTGCTG-5' RW 5'-CTTCCAGTGTCCAGACGCACCA-3'	Ferraz et al. (1997)	904
NK1	FW 5'-CATCAACCCAGATCTCTACC-3' RW 5'-GCTGGAGCTTTCTGTCATGGA-3'	King et al. (2001)	380
NK-2	FW 5'-CATCACTGTGGACGAGGGGG-3' RW 5'-TGTCTTCCTCAGTTGGTGTC-3'	King et al. (2001)	491
VPAC1	FW 5'-TCCGAGCGGAAGTACTTCTG-3' RW5'-ACCTGGGCCTTGAAGTTGTC-3'	Vaccari et al. (2006)	359
VPAC2	FW 5' -CACTAGTGATGGGTGGTCGG-3' RW 5'- GCCAGTAGAAGTTCGCCATG-3'	Vaccari et al. (2006)	399
COX-1	FW5'-CCTTCTCCAACGTGAGCTACTA-3' RW5'-TCCTTCTCCTGTGAACTCCT-3'	Ferraz et al. (1997)	1036
COX-2	FW5'-AGACAGATCATAAGCGAGGACC-3' RW5'-CACTTGCATTGATGGTGGCTGT-3'	Ferraz et al. (1997)	1158
TRPV-1	FW5'-TCATGGGTGAGACCGTCAACAAG-3' RW5'-TGGCTTAAGGGATCCCGTATAAT-3'	Xin et al. (2005)	428

GAPDH	FW 5'CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' RW 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	Ferraz et al. (1997)	400
--------------	---	----------------------	-----

Tabela 2: Características do ciclo de amplificação dos *primers*

Etapas da amplificação				
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	N° ciclos
nNOS	94 °C/60 seg	67 °C/45 seg	72 °C/90 seg	33
iNOS	94 °C/60 seg	67 °C/45 seg	72 °C/90 seg	40
eNOS	94 °C/60 seg	67 °C/45 seg	72 °C/90 seg	33
NK-1	94 °C/45 seg	60 °C/45 seg	72 °C/60 seg	40
NK-2	94 °C/45 seg	60 °C/45 seg	72 °C/60 seg	35
VPAC1-R	94 °C/30 seg	57 °C/45 seg	72 °C/30 seg	35
VPAC2-R	94 °C/30 seg	57 °C/45 seg	72 °C/30 seg	35
COX-1	94 °C/60 seg	65 °C/30 seg	72 °C/60 seg	40
COX-2	94 °C/60 seg	65 °C/30 seg	72 °C/60 seg	38
TRPV-1	94 °C/45 seg	60 °C/45 seg	72 °C/60 seg	35
GAPDH	94 °C/60 seg	65 °C/30 seg	72 °C/60 seg	29

2.5.3 Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (3-NT) e SOD-1 via Western blot em homogenatos de intestino

As amostras de intestino foram pesados e homogeneizados (1:5) em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) contendo 1 mM de PMSF. Um volume de 130 µl de amostras (concentração de proteínas totais = 3 mg/ml) foi diluída com 30 µl de tampão de Laemmli (0.0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e fervida durante 10 min, exceto amostra para medida de nitrotirosina. Após rápida centrifugação (10.000 g; 30 seg), as proteínas das amostras (25 µg/linha) foram separadas por eletroforese em gel de

poliacrilamida (10% para nitrotirosina e 15% para SOD-1), contendo o tampão composto por TRIS (25 mM), 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE; Laemmli, 1970) e Glicina 192mM) em pH 8,3.

A separação eletroforética das proteínas foi realizada com uma intensidade de corrente constante (35 mA, 1 e¹/₂ h), resultando em valores de voltagem variando entre 90 a 180V. As bandas protéicas foram transferidas eletroforeticamente pelo sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem de 150 mA (voltagem ~40V, 2h). A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0.1%) e etanol (18%).

Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com corante Commassie blue (0.1% em solução aquosa de ácido acético 5% e etanol 25%), e as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,2% de Ponceau + 3% de ác. Tricloro acético + 3% de ác. sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína em tampão TBS-t (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl, pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15 - 18 horas, a 18 °C com anticorpos primários específicos diluídos em tampão TBS-t.

Após a incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (AP) ou peroxidase (HRP) diluídos em tampão TBS-t durante 2 horas. As membranas foram submetidas a uma série de lavagens com TBS-t. As bandas imunoreativas foram reveladas mediante um kit de revelação de quimioluminescência (Lumi-Phos WB para AP ou West Pico Super Signal para HRP, Pierce, EUA). O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (MW: 10 a 250 kDa, Bio Rad, CA). As imagens foram captadas (Alpha Innotech Corp., EUA) e a intensidade das bandas foi estimada por análise densitométrica. Bandas coradas com Ponceau foram usadas como controle da quantidade de proteína aplicada de cada amostra. Os resultados

foram expressos em unidades arbitrárias com relação ao grupo controle (100%).

Tabela 3: Características dos anticorpos primários e secundários utilizados.

Anticorpo 1°/ Procedência	Diluição	Anticorpo 2°/ Procedência	Diluição
NT (monoclonal, camundongo) Upstate Lab., EUA	1:2.000	Anti camundongo (cabra)+AP BioRad, EUA	1:3.000
SOD 1 (Cu/Zn) (policlonal, ovelha) CALBIOCHEM	1:1.000	Anti ovelha (coelho)+HRP CALBIOCHEM	1:3.000

2.5.4 Quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6

As amostras de intestino de ratos (n=4-5 por grupo) foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS) contendo Tween-20 (0,05%), albumina de soro bovino (BSA) 0,01%, fenil-metil-sulfonil-fluoride (PMSF 0,5 mM), aprotinina (2 μ g/ml), leupeptina (10 μ g/ml) e inibidor de tripsina (10 μ g/ml; 1g:5 ml de tampão) e posteriormente centrifugadas (1000g, 15 minutos). O sobrenadante (10 μ l) de cada amostra foi transportado para microplacas previamente sensibilizadas com os anticorpos primários específicos (100 μ l; 10 μ g/ml) diluídos em tampão carbonato (100 mM), contendo NaCl (pH 9,6) para as citocinas IL-1 μ e IL-6 e, em tampão fosfato (200mM, pH 6,5) para o TNF- α . A seguir, as placas foram mantidas em geladeira por 18 horas e depois foram lavadas, quatro vezes, com tampão fosfato de sódio (PBS) contendo 0,05% de tween-20 (PBS-t). O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com a solução PBS (200 μ l) contendo gelatina (3%) na temperatura à 37°C, por 3 horas. Em seguida, as placas foram lavadas, quatro vezes, com o PBS-t.

Curvas padrão foram realizadas em duplicata a partir de concentrações máximas de 2000 pg/ml para o TNF- α e 1000 pg/ml para as citocinas IL-1 β e IL-6, diluídas (1:2) seriadamente na placa de 96 poços, até o último poço. Um

poço contendo somente tampão de homogeneização foi usado como controle negativo. A seguir, as placas foram mantidas em geladeira por 18 horas e em seguida, lavadas (4X) com PBS-t.

Após esse período, os anticorpos secundários foram diluídos em PBS-t contendo 0,1% de albumina bovina (BSA 200 ng/ml). Amostras de 100 µl desses foram dispostos em cada poço e incubou-se por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas (4 X) com PBS-t. Finalmente, um volume de 100 µl da solução de estreptavidina (diluída em PBS-t contendo 0,1% BSA) foi adicionado às amostras dispostas na placa e reservada por uma hora em temperatura ambiente. Nova lavagem com PBS-t (4x) foi realizada.

A revelação foi realizada mediante adição do volume de 100 µl do substrato de revelação (½ volume de solução A – TMB- e ½ volume de solução B -H₂O₂) nessas amostras. Após 30 minutos em temperatura ambiente isento de luz, a reação foi inibida com a adição de H₂SO₄ (2N). As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 450 nm e corrigidas a 570 nm. Os valores foram expressos em pg/g de amostras de tecido.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± EPM e submetidos à análise do teste t de Student não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade da MPO em intestino de fetos com gastrosquise experimental

A figura 3 demonstra que a indução da gastrosquise experimental, após 3 dias, promoveu aumento significativo na atividade da MPO no intestino desses animais comparado com o grupo controle, mas não sham. Da mesma forma, um aumento significativo da atividade MPO foi observado no grupo de animais sham em relação ao controle (Figura 3).

Nota-se que o tratamento com dexametasona promoveu redução dos níveis basais da enzima MPO no grupo sham, quando comparados com seus respectivos grupos sem tratamento. Entretanto, esse tratamento não foi capaz de afetar o aumento de atividade da MPO no grupo gastrosquise em relação ao respectivo grupo sem dexametasona (Figura 3).

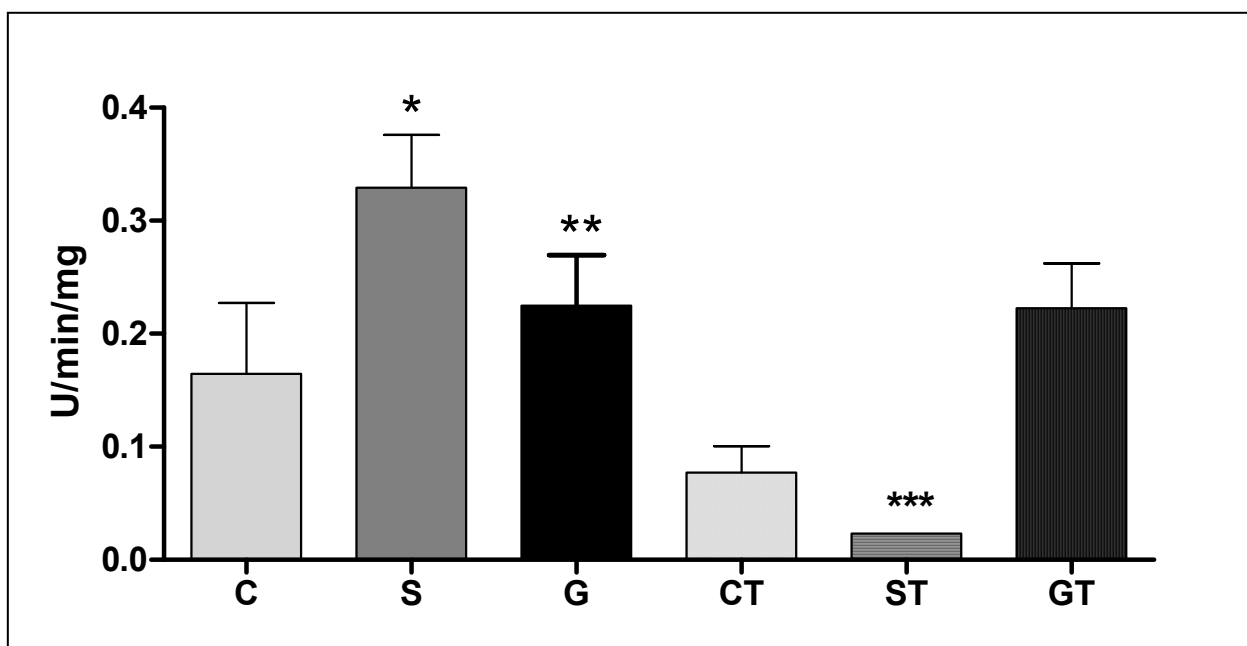


Figura 3. Ensaio de Mieloperoxidase em amostras de intestinos de fetos de ratos Sham (S), Controle (C), com Gastrosquise (G), na ausência e presença do tratamento com dexametasona (CT), (ST) e (GT). Os dados estão expressos como a média \pm E.P.M. para $n=4$ animais. $p < 0,05$, $p < 0,01$ versus Controle; $***p < 0,001$ versus Sham. Conforme Teste t não pareado.**

3.2 Avaliação da expressão gênica, por RT-PCR, para os receptores dos neuropeptídeos da família das taquicininas (NK₁ e NK₂), do VIP (VPAC1 e VPAC2) e TRPV-1 em intestinos de fetos com gastrosquise

Após 3 dias da indução da gastrosquise, não foi observado aumento significativo na expressão (RNAm) do receptor NK₁ (Figura 4A), VIP (VPAC1 e VPAC2; Figuras 5A e B) e TRPV1 (Figura 6) no intestino desses animais em comparação aos animais controle e sham.

Já a expressão gênica dos receptores NK₂ (Figura 4B) no intestino do grupo gastrosquise e sham foram menores em relação ao grupo controle.

Animais controle, sham e com gastrosquise submetidos ao tratamento com dexametasona, exibiram no intestino um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão (RNAm) dos receptores NK₁ (Figura 4A) em comparação aos respectivos grupos sem tratamento (Figura 4A). O tratamento com dexametasona não foi capaz de alterar significativamente a expressão (RNAm) dos receptores NK₂ (Figura 4B), de VIP (VPAC1, VPAC2; Figura 5A e B) e TRPV1 (Figura 6A).

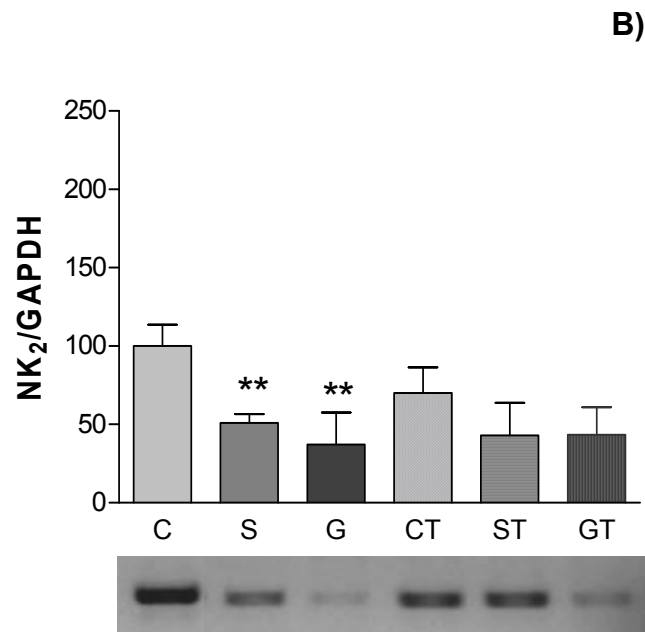
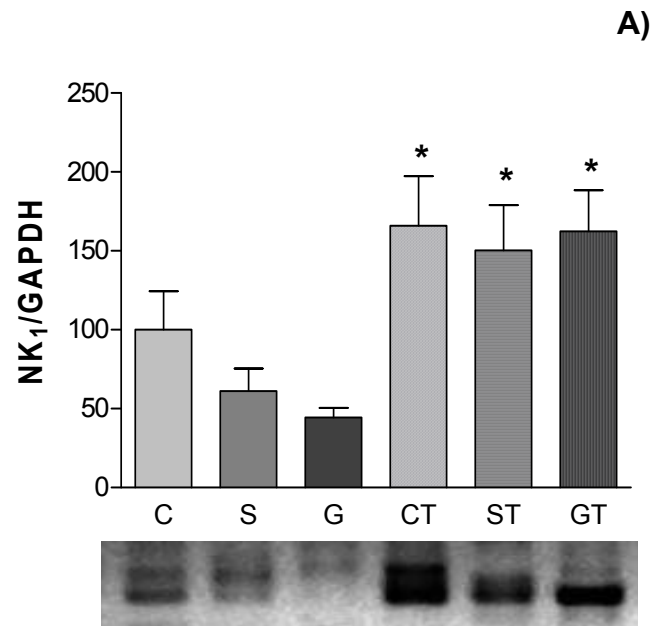


Figura 4. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores de taquicinas NK₁ (painel 4A) e NK₂ (painel 4B) em intestino de fetos. As barras representam níveis de expressão de mRNA para NK₁ e NK₂, estimados por densitometria, em intestino de animais controle (C), sham (S) e gastrosquise (G) na ausência e presença da dexametasona: controle com tratamento (CT), sham com tratamento (ST) e gastrosquise com tratamento (GT). As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 5 µg do RNA total. O GAPDH foi usado como controle interno. Os dados estão expressos como a média ± E.P.M. para n= 4 animais. * $p < 0,05$ versus respectivos grupos sem tratamento. ** $p < 0,01$ versus Controle. Conforme Teste t não pareado.

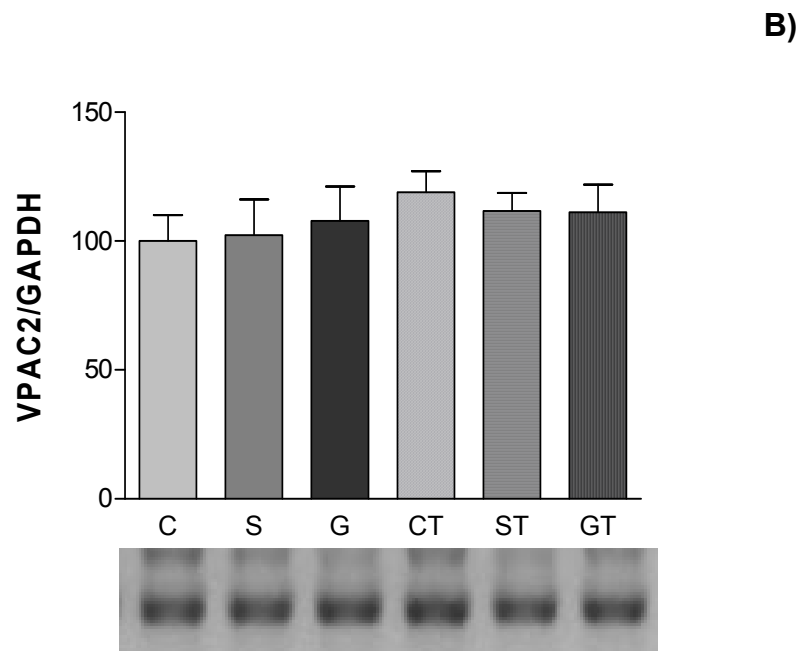
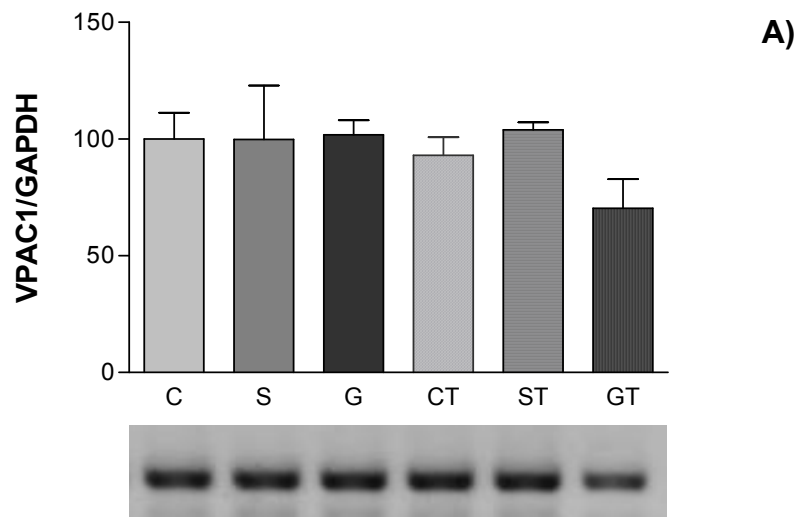


Figura 5. Efeito da gastroquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de VPAC1 (painel 5A) e VPAC2 (painel 5B) em intestino de fetos. As barras representam níveis de expressão de mRNA para VPAC1R (painel A) e VPAC2R (painel B), estimados por densitometria, em intestino de animais controle (C), sham (S) e gastroquise (G) na ausência e presença da dexametasona: controle com tratamento (CT), sham com tratamento (ST) e gastroquise com tratamento (GT). As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 5 µg do RNA total. O GAPDH foi usado como controle interno. Os dados não foram estatisticamente significativos entre os grupos analisados de acordo com Teste t não pareado.

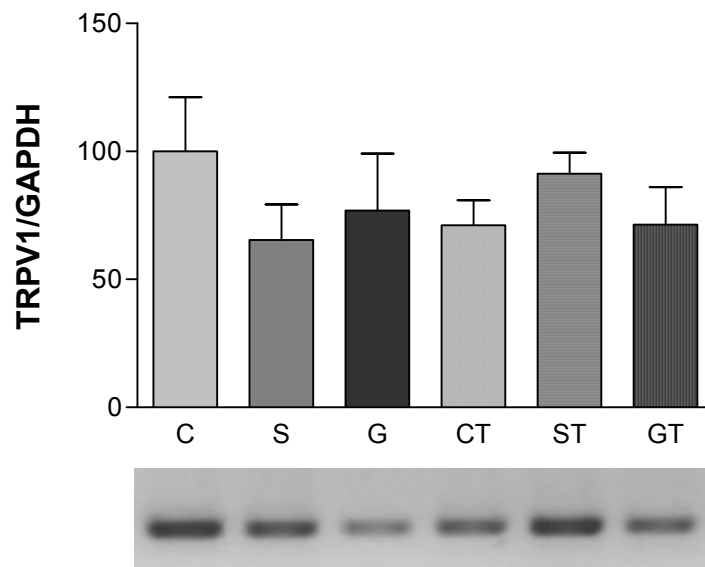


Figura 6. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) de TRPV1 em intestino de fetos. As barras representam níveis de expressão de mRNA para TRPV1, estimados por densitometria, em intestino de animais controle (C), sham (S) e gastrosquise (G) na ausência e presença da dexametasona: controle com tratamento (CT), sham com tratamento (ST) e gastrosquise com tratamento (GT). As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 5 µg do RNA total. O GAPDH foi usado como controle interno. Os dados não foram estatisticamente significativos entre os grupos analisados de acordo com Teste t não pareado.

3.3 Quantificação da expressão gênica das diferentes isoformas de NO sintases (NOs) em intestino de ratos com gastrosquise experimental

A expressão gênica da isoforma iNOS (Figura 7B), foi aumentada nos animais com gastrosquise ($p < 0,05$) quando comparada com fetos sham, mas o mesmo não foi observado nas isoformas neuronal nNOS (Figura 7A) e endotelial eNOS (Figura 7C).

Nos animais com gastrosquise que receberam a dexametasona, nota-se aumento marcante da expressão gênica das três isoformas, quando comparados aos grupos sem dexametasona (Figuras 7A, 7B e 7C).

Animais com gastrosquise e tratados com dexametasona exibiram no intestino um aumento marcante da expressão gênica das três isoformas da enzima de NO, quando comparados aos grupos sem dexametasona (Figuras 7A, 7B e 7C).

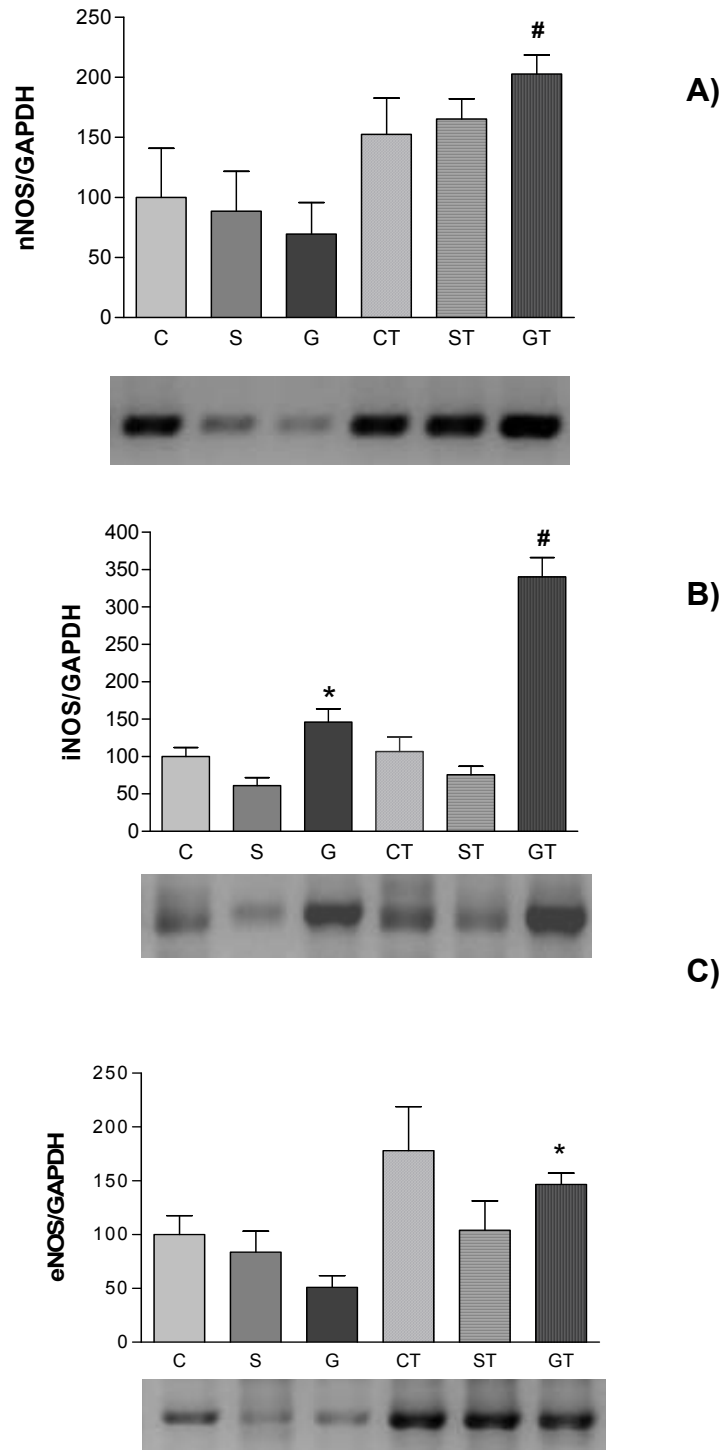


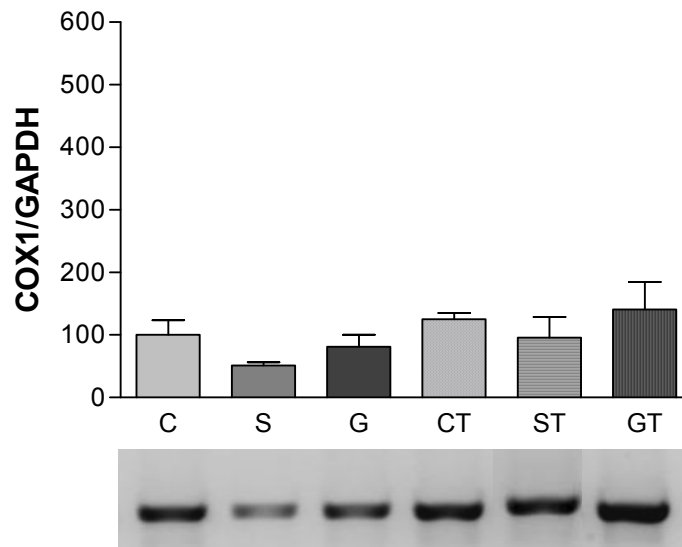
Figura 7. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica (RNAm) das diferentes isoformas do NO sintase em intestinos de fetos. As barras representam níveis de expressão de mRNA para nNOS (A), iNOS (B) e eNOS (C), estimados por densitometria, em intestino de animais controle (C), sham (S) e gastrosquise (G) na ausência e presença da dexametasona: controle com tratamento (CT), sham com tratamento (ST) e gastrosquise com tratamento (GT). As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 5 µg do RNA total. O GAPDH foi usado como controle interno. $p < 0,05$ versus grupo Sham e $^{\#}p < 0,05$ versus grupo Gastrosquise. Conforme Teste t não pareado.

3.4 Quantificação da expressão gênica das isoformas de cicloxigenase em intestino de fetos com gastrosquise experimental

A expressão gênica da COX-2 (Figura 8B), mas não da COX-1 (Figura 8A), foi estatisticamente maior nos animais com gastrosquise ($p < 0,01$) em comparação aos animais controle ou sham.

Mediante o tratamento com a dexametasona, observa-se que os animais com gastrosquise exibiram um sinergismo da expressão gênica da COX-2 em relação ao respectivo grupo sem tratamento. O tratamento com dexametasona não afetou a expressão gênica da COX-1 no intestino de fetos com gastrosquise ou respectivos grupos controle e sham (Figura 8 A).

A)



B)

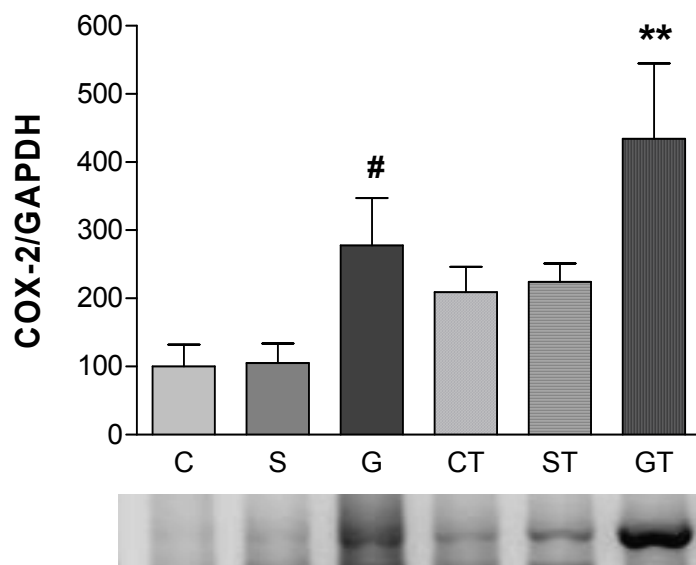


Figura 8. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão gênica das isoformas da COX em intestino de fetos. As barras representam níveis de expressão de mRNA para COX-1 (painel **A**) e COX-2 (painel **B**), estimados por densitometria, em intestino de animais controle (C), sham (S) e gastrosquise (G) na ausência e presença da dexametasona: controle com tratamento (CT), sham com tratamento (ST) e gastrosquise com tratamento (GT). As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 5 μ g do RNA total. O GAPDH foi usado como controle interno. Os dados estão expressos como a média \pm EPM; n=4 fetos por grupo; ** $p < 0,01$ versus Controle com tratamento e Sham com tratamento e # $p < 0,05$ versus Controle e Sham. Conforme Teste t não pareado.

3.5 Análise da expressão de superóxido dismutase (SOD-1) e proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) por Western blot em intestino de fetos

A análise de Western blot não revelou alterações significativas na expressão basal da SOD-1 em homogenatos de intestino de animais com gastrosquise em relação aos animais controle e sham (Figura 9).

A indução da gastrosquise não foi capaz de induzir aumento da expressão de proteínas nitradas no intestino desses animais em relação aos controles. Contudo, um aumento expressivo ($p < 0,01$) foi observado na expressão basal da 3-NT em homogenatos de intestino de animais com gastrosquise tratados com dexametasona em relação aos grupos controle e sham (Figura 10). O aumento de expressão de proteínas contendo 3-NT no grupo GCT se deve principalmente às bandas marcadas com as setas (pesos moleculares aproximados de 27, 60 e 93 kDa)

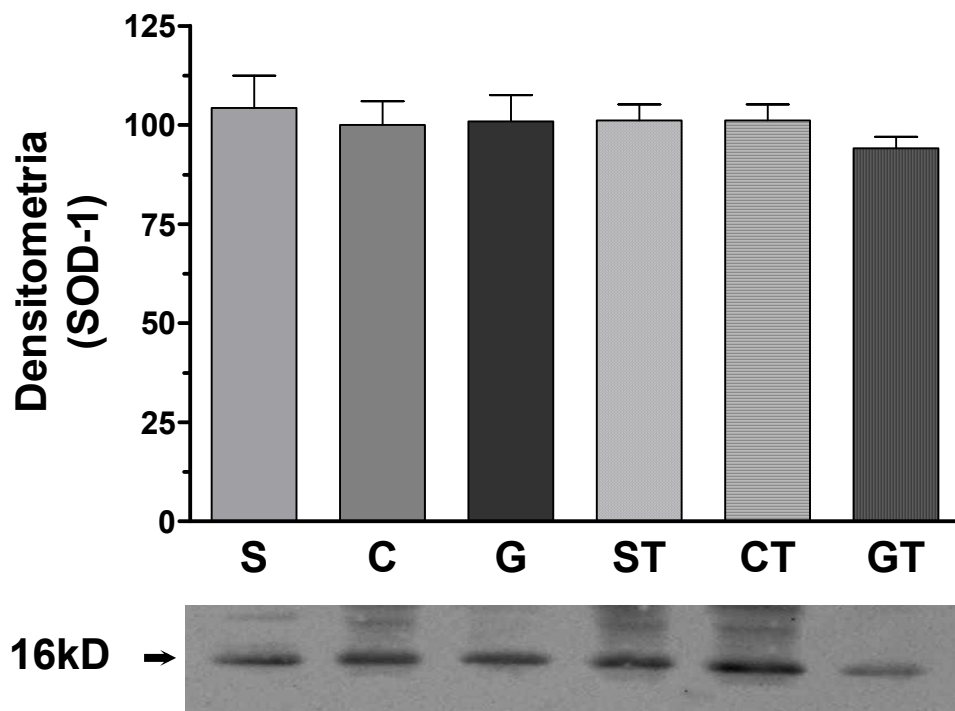


Figura 9. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão protéica por Western Blot para SOD-1 em intestinos de fetos. As barras representam as intensidades relativas das bandas de SOD-1 quantificadas por densitometria em amostras de intestinos de fetos Sham (S), Controle (C), com Gastrosquise (G) e submetidos ao tratamento com glicocorticóide Sham (GT), Controle (CT) e Gastrosquise (GT). O ponceau foi usado como controle de proteína aplicada. Os dados estão expressos como a média \pm EPM; n=4 fetos por grupo. Não foi observada qualquer diferença significativa entre os diversos grupos. Conforme Teste t não pareado

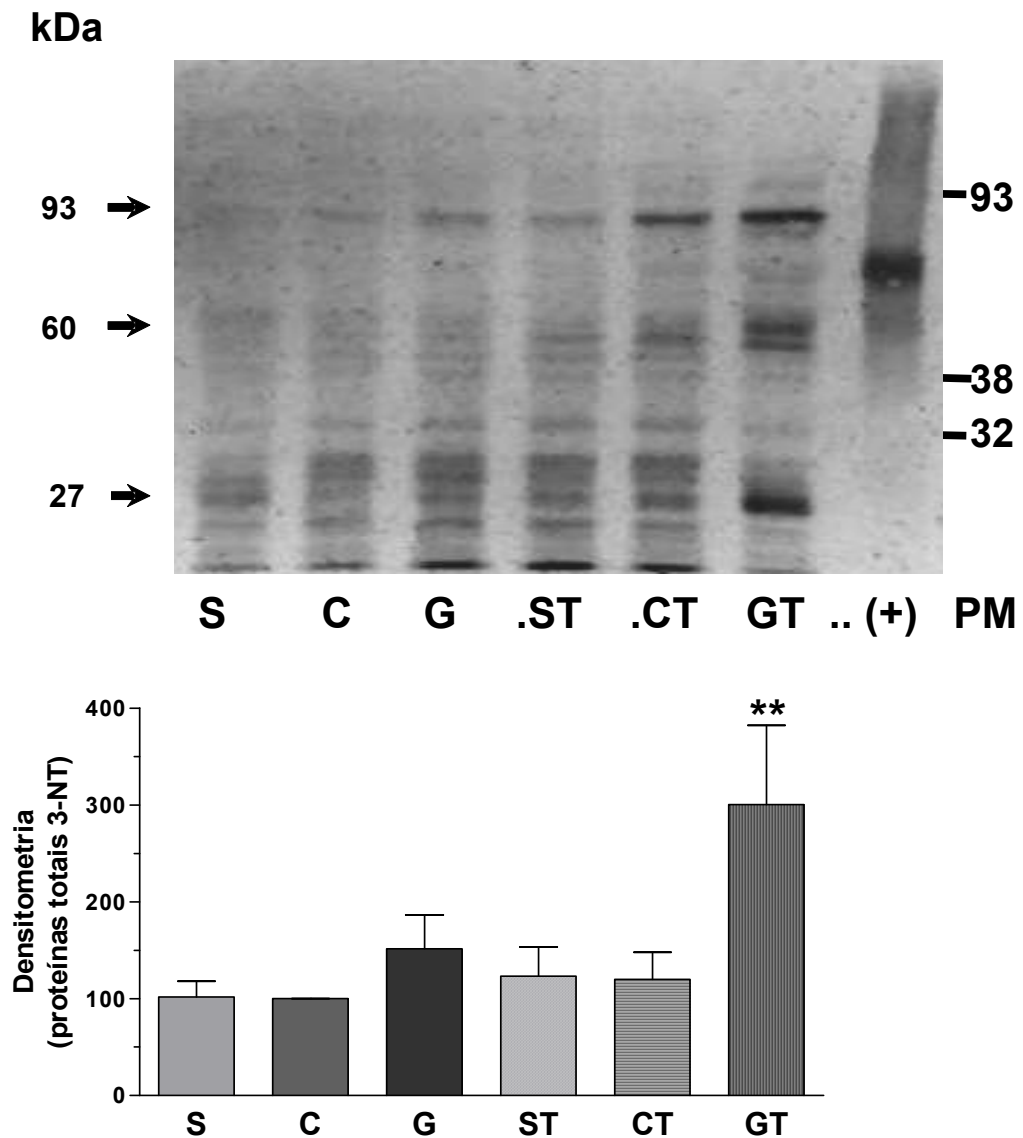


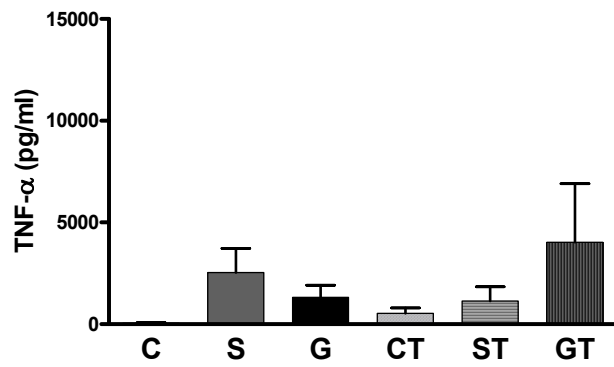
Figura 10. Efeito da gastrosquise experimental sobre a expressão de 3-NT em proteínas de amostras de intestinos de fetos por Western Blot. As barras representam as intensidades relativas das bandas totais de proteínas contendo 3-NT (quantificadas por densitometria) em amostras de intestinos de fetos Sham (S), Controle (C), com Gastrosquise (G) e submetidos ao tratamento com dexametasona: Sham (ST), Controle (CT) e Gastrosquise (GT). Nitroalbumina (2µg) foi usada como controle positivo. Os dados estão expressos como a média ± EPM; n=4 fetos por grupo. ** $p < 0,01$ versus grupos Gastrosquise, Controle, Sham, Sham com tratamento e Controle com tratamento. Conforme Teste t não pareado. O aumento de expressão de proteínas contendo 3-NT no grupo GT se deve principalmente às bandas marcadas com as setas (pesos moleculares aproximados de 27, 60 e 93 kDa).

3.6 Determinação das concentrações de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no intestino de fetos com gastrosquise

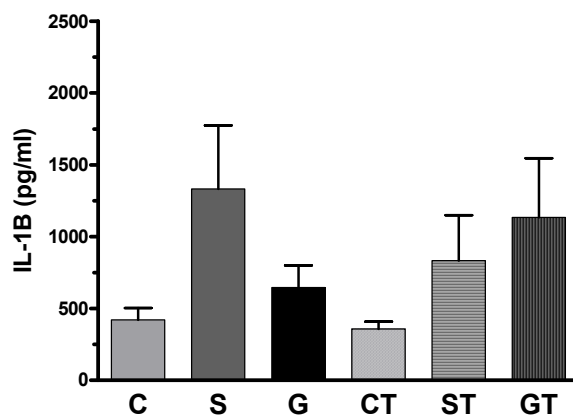
A determinação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, por ELISA, em homogenatos de intestino dos diferentes grupos experimentais revelou que somente a concentração de IL-6 aumentou significativamente no grupo de fetos com gastrosquise em relação ao grupo controle, mas não o grupo sham ($p < 0,05$; Figura 11 C).

Os níveis dessas citocinas não foram alterados nos animais controle, sham ou gastrosquise tratados com dexametasona quando comparado aos respectivos grupos sem tratamento (Figura 11 A-C).

A) TNF- α



B) IL-1 β



C) IL-6

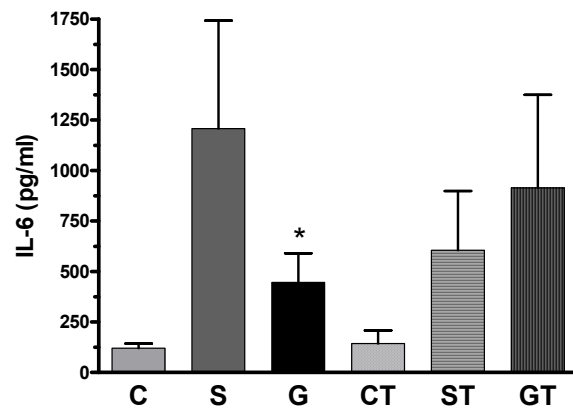


Figura 11. Concentração das citocinas TNF- α (Painel A), IL-1 β (Painel B) e IL-6 (Painel C) no intestino dos diferentes grupos experimentais. Cada símbolo representa o valor absoluto quantificado em cada amostra de intestino para n= 3 - 5. $p < 0,05$ versus grupo controle. Conforme Teste t não pareado.

Tabela 4. Resumo de todos os resultados obtidos neste estudo. # quando comparado ao Grupo C; * quando comparado ao grupo S e @ quando comparado ao grupo G. Flecha ↑ = aumento e Flecha ↓ = diminuição.

RESUMO DOS RESULTADOS						
MARCADORES	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	C	S	G	CT	ST	GT
MPO		↑ #	↑ #		↓ *	
NK ₁				↑ #	↑ *	↑ @
NK ₂		↓ #	↓ #			
VPAC1						
VPAC2						
TRPV-1						
nNOS						↑ @
iNOS			↑ #			↑ @
eNOS						↑ @
COX-1						
COX-2			↑ #			↑ @
SOD-1						
3-NT						↑ @
TNF-α						
IL1-β						
IL-6			↑ #			

4 DISCUSSÃO

Embora progressos tenham ocorrido sobre as técnicas cirúrgicas e cuidados pós-operatórios na gastrosquise, que contribuíram como fatores decisivos para o aumento da sobrevivência desses pacientes, o dano intestinal causado pelo processo inflamatório é ainda responsável por elevada morbidade e, eventualmente, pela mortalidade desses pacientes. Neste sentido, escassas informações farmacológicas ou bioquímicas existem relacionadas à presença de marcadores inflamatórios envolvidos na gastrosquise.

Este estudo apresentou o objetivo original de investigar o possível papel de mecanismos neurovasculares e oxidativos na fisiopatogenia da gastrosquise em ratos. O rato foi escolhido como animal de experimentação por apresentar características vantajosas, tais como o baixo custo, curto tempo de gestação (por volta de 21,5 dias) e maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos) com um menor índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro. Além disto, o tamanho dessa espécie favorece melhor acessibilidade ao procedimento experimental e exibe semelhanças à espécie humana, no que tange às respostas inflamatória e alérgica (BITTENCOURT et al., 2006).

O neutrófilo, considerado fagócito profissional, participa ativamente da inflamação aguda. Ele realiza o processo de fagocitose similar ao macrófago, porém não apresenta antígenos. Seu principal mecanismo de morte celular é o sistema enzimático MPO-hialida presente em seus grânulos, que resulta na formação de radicais HOCl, responsáveis pela oxidação de moléculas ou microorganismos fagocitados.

No tecido intestinal de fetos com gastrosquise a avaliação da atividade da MPO revelou um aumento significativo desta enzima quando comparado ao grupo controle, mas não o grupo sham que também exibiu aumento em relação ao controle. Estes resultados indicam que em fetos com gastrosquise (ou sham) células polimorfonucleares (PMN) transmigraram dos vasos sanguíneos para o intestino desses. Dados recentes mostram um aumento de peso (edema) no intestino de fetos de ratos com gastrosquise (BITTENCOURT et al., 2006), sugerindo que, assim como em humanos, um processo edematoso é observado no intestino de sujeitos com gastrosquise. Ademais, o líquido

amniótico das gestantes com fetos com gastrosquise apresenta níveis elevados de PMN e mononucleares (MORRISON et al., 1998). É importante salientar que neste estudo, a indução do modelo com gastrosquise ocorre concomitantemente com a indução de fetos controle, sham e gastrosquise numa única matriz de rata prenhe. Desta forma, não se podem excluir possíveis efeitos em comum sobre os diferentes grupos de fetos da mesma matriz. Entretanto, experimentos utilizados matrizes diferentes para cada grupo experimental ainda não foram realizados no sentido de confirmar tal hipótese.

Dentre os múltiplos aspectos do mecanismo inflamatório neurovascular optou-se por mensurar bioquimicamente neste modelo a expressão gênica (RT-PCR-semi-quantitativo) dos receptores de taquicininas (NK1, NK2), VIP (VPAC-1, VPAC-2) e vanilóide (TRPV-1). A tentativa de elucidar os componentes oxidativos e outros na gastrosquise experimental foi avaliada pela análise da expressão (via RNA) da NOS (nNOS, iNOS, eNOS) e da COX (COX-1 e COX-2) no intestino desses animais. Além disto, avaliou-se a expressão protéica (por Western Blot) de SOD-1 e 3-NT.

No trato gastrintestinal as taquicininas (substancia P e NKA) atuam como neurotransmissores em circuitos nervosos, onde regulam várias funções fisiológicas e fisiopatológicas, como a motilidade intestinal, secreção e funções vasculares (SHIMIZU et al., 2007). Receptores para tais substâncias foram encontrados em células intersticiais de Cajal (localizadas na camada mais profunda do plexo muscular), músculo e epitélio logo após o nascimento do feto. Esses atingem concentrações máximas após sete dias de vida (VANNUCCHI et al., 1997). Além disto, fibras imunorreativas para SP foram encontradas no plexo mioentérico de fetos (CHEN et al., 2004) e níveis circulantes elevados de NKB foram detectados em mulheres com pré-eclampsia durante o terceiro trimestre de gravidez (PAGE et al., 2006). É interessante também ressaltar que na condição de doença inflamatória intestinal, tal como a doença de crohn e colite ulcerativa a expressão dos receptores para taquicininas mostrou-se elevadas em células imunológicas (GROSS et al., 2007). Embora graus variados da expressão de receptores de taquicininas tenham sido demonstrados no trato gastrintestinal de animais em estados normal e patológico, este estudo não demonstrou no intestino de fetos com gastrosquise nenhum aumento significativo na expressão gênica dos

receptores NK₁ e NK₂, quando comparados aos animais controles. Contudo, nota-se que a expressão gênica dos receptores de taquicininas, especialmente do tipo NK₂, nos fetos com gastrosquise foi diminuída. Partindo do pressuposto que o aumento da expressão de receptores de taquicininas está relacionado à maior produção e/ou liberação de taquicininas (HUGHES et al., 2007), o presente resultado sugere o oposto. Entretanto não se sabe ao certo como a indução da doença *per se* possa contribuir para a baixa regulação na geração de taquicininas e, conseqüentemente, de seus receptores.

Ademais, sabe-se que o neuropeptídeo VIP, via ativação de seus receptores específicos VPAC1 e VPAC2, atua como importante modulador na regulação da produção de mediadores antiinflamatórios. No trato gastrointestinal o VIP também atua no controle da musculatura lisa intestinal. O VIP pode estar ainda implicado na fisiopatologia de doenças inflamatórias intestinais (CHORNY et al., 2006; CARLOS et al., 2007), muito embora neste modelo de gastrosquise, não foi observado nenhuma alteração importante na expressão (RNAm) dos seus receptores (VPAC-1 e VPAC-2) para VIP no intestino dos animais, indicando que tal mediador e seus receptores não apresentam papel relevante na gastrosquise experimental em ratos. Este resultado é curioso, pois é sabido que na gastrosquise há perda da motilidade intestinal (BITTENCOURT et al., 2006), e segundo trabalho de Eysselein et al. (1991), as alterações da musculatura lisa intestinal de pacientes com doença de Crohn, associada com a diminuição do VIP sugere que o VIP tem um importante papel na fisiopatologia da motilidade intestinal em pacientes com doença intestinal inflamatória, devido a sua atuação no controle da musculatura intestinal.

Em continuidade ao presente estudo é importante lembrar que a inflamação neurogênica ocorre como resultado da liberação de neuropeptídeos das fibras sensoriais mediante ativação, principalmente, dos receptores TRPV1 (CATERINA et al., 1997; LEE et al., 2003). Neste sentido, na doença inflamatória gastrointestinal, síndrome do intestino irritável, recente trabalho (JONES et al., 2005) mostra que a expressão gênica dos receptores TRPV1 encontra-se elevada no cólon dos animais. Em contraste, observou-se neste estudo que o intestino dos animais com gastrosquise não exibiu alteração significativa da expressão gênica dos receptores TRPV1, indicando que a instalação do processo inflamatório da gastrosquise não parece depender de

mecanismos dependentes do receptor TRPV1. No conjunto, estes resultados mostram que na gastrosquise experimental em ratos foi observada uma baixa regulação na geração das taquicininas via avaliação do receptor NK₂. Entretanto não se sabe ao certo como a indução da doença *per se* possa contribuir para este resultado.

Em geral, o termo estresse oxidativo define a situação em que existe um desequilíbrio entre espécies oxidantes e redutoras no meio intracelular, com predominância das primeiras. Assim, o aumento de espécies reativas ROS e RNS causa o estresse oxidativo, responsável por danos tissulares e outros processos. Na condição de gastrosquise, pouco se sabe sobre o envolvimento de espécies reativas e a etiologia dessa doença (O'NEIL et al., 1974; STRINGEL et al., 1979; TIBBOEL et al., 1985). Segundo Reed et al. (2007), existe uma correlação entre o aumento na produção de espécies reativas na cavidade abdominal e a adesão intra-abdominal. Ademais, na gastrosquise em humanos o conhecimento do dano intestinal causado pela exposição das alças ao LA, especialmente no final da gestação, é de fundamental importância para traçar estratégias no tratamento dessa patologia. Em nosso modelo, a análise de Western blot não revelou alterações significativas na expressão basal da SOD-1. A SOD pertence à família da metaloenzimas e convertem o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A SOD é um tipo de antioxidante produzido pelo corpo que atua enzimaticamente. Há três principais formas de SOD: cobre-zinco-SOD (SOD1) no espaço intracelular, a manganês-SOD (SOD2) na mitocôndria e a SOD extracelular (SOD3) (CORRÊA-GIANNELLA et al., 2008). Estas enzimas são as mais extensivamente estudadas no processo do estresse oxidativo (em homogenato de intestino dos animais, indicando que essa defesa enzimática não foi alterada nesta condição patológica em ratos.

Sabendo que a análise de resíduos de nitrotirosina em tecido ou em fluídos biológicos vem sendo amplamente empregada para monitorar a produção de espécies reativas *in vivo* (SALVEMINI et al., 2006), averiguamos neste modelo o papel deste marcador. Contudo, observou-se que a gastrosquise em ratos não promoveu o aumento da expressão de proteínas nitradas (3-NT) no intestino desses animais, excluindo, portanto a participação

de 3-NT na indução desta doença em ratos. Kruidenier et al. (2007) relataram um aumento de 3-NT na mucosa inflamada de pacientes com colite ulcerativa.

Por outro lado, foi interessante observar que os ensaios de PCR deste estudo mostraram um aumento significativo na expressão gênica da iNOS em células do intestino de fetos com gastrosquise. Este achado sugere um possível aumento na geração de NO, o qual tem sido considerado um mediador tóxico na gastrosquise, pois a inibição da síntese de NO preveniu marcadamente as lesões intestinais em embriões de galinha (DILSIZ et al., 1999) e coelhos com gastrosquise (BEALER et al., 1996). Diante destes resultados, é possível postular que o aumento da expressão de iNOS e, possivelmente, da produção de NO parece contribuir para a geração dos sinais clínicos inflamatórios bem como da malformação e seqüelas da função motora do intestino de animais com gastrosquise. Em contrapartida, o mesmo não foi observado nas isoformas neuronal nNOS e endotelial eNOS. O trabalho de Van Crombruggen et al. (2008), mostra que os níveis de iNOS influenciaram no modelo de colite em ratos, mas os níveis de nNOS não influenciaram neste processo inflamatório. E segundo estudo de Dijkstra et al. (2004) a ausência de eNOS pode aumentar a susceptibilidade de danos no trato gastrintestinal, pois o eNOS tem como uma função de dilatar os vasos sanguíneos da mucosa intestinal e prevenir a agregação leucocitária.

A seguir, a proposta do presente estudo consistiu em avaliar se a geração de NO formado endogenamente (via avaliação indireta do aumento da expressão de iNOS) neste modelo de gastrosquise está relacionado a um aumento sinérgico da expressão de COX.

A geração de $O_2^{\cdot -}$ diminui a biodisponibilidade do NO livre, enquanto conduz à formação aumentada de $ONOO^{\cdot -}$. O $O_2^{\cdot -}$ capta efetivamente o NO, formando o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$), que é responsável pela ativação da via ciclooxigenase, ligando os prostanóides à via NO pela sinalização redox. A ativação da ciclooxigenase (COX) requer concentrações diferentes de $ONOO^{\cdot -}$ para ativar as isoformas desta enzima (COX-1 e COX-2). Salienta-se que a COX-2 é fator crítico na propagação da resposta inflamatória pela vasodilatação, já a COX-1, pela vasoconstrição, agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (SIGNORI et al., 2007).

Conforme bem estabelecido, a resposta inflamatória, na sua grande maioria, envolve a participação de prostaglandinas e outros mediadores lipídicos liberados a partir do ácido araquidônico via ação enzimática das COXs, tipo 1 e 2. A análise por PCR semi-quantitativo da expressão gênica da COX-2, mas não da COX-1, neste estudo mostrou um aumento significativo desta enzima no intestino de animais com gastrosquise em comparação aos animais controle ou sham.. Corroborando este dado, Roberts et al. (2001) observaram um aumento da expressão de COX-2 em células neurais do plexo mioentérico de humanos com doença intestinal inflamatória (IBD). Diante desses e de nossos achados, é possível sugerir que a maior produção de mediadores lipídicos (prostanóides) no tecido intestinal de fetos com gastrosquise, decorrente da maior expressão gênica da COX-2, parece estar associada a uma maior produção de ROS, as quais contribuem para o dano intestinal que culmina numa perda da função motora do aparelho gastrointestinal. Corroborando com estes resultados, segundo estudo de Singer et al. (1998), não foi detectada a presença de COX-1 em pacientes com doença inflamatória intestinal, mas foi detectado a presença de COX-2. Sabe-se que as etapas envolvidas na resposta inflamatória de fase aguda são resultados de um complexo processo envolvendo vários mediadores químicos, dentre eles as citocinas. A produção constitutiva das citocinas é normalmente baixa ou ausente e, portanto, a produção dessas é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição ou tradução. As ações reguladas pelas citocinas são de curta duração via receptores específicos localizados na superfície celular. Em geral, estas ações levam ao aumento (ou redução) na taxa da proliferação celular ou mudança no estado de diferenciação celular (FASCHING et al., 2005). As citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11 e o fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF) desempenham um papel importante na inflamação aguda. As principais fontes celulares da IL-1 β são as células mononucleares, fibroblastos, queratinócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T (ambos Th1 e Th2) e B (FEGHALI e WRIGHT, 1997). Tanto a IL-1 β quanto TNF- α podem causar febre em decorrência do aumento na síntese da PGE2 no hipotálamo (WARREN, 1990). O TNF- α é uma citocina produzida por mastócitos, neutrófilos, monócitos e células epiteliais em resposta a uma grande variedade de estímulos imunológicos e fisiológicos. Esta está associada

a uma variedade de sinais e sintomas observados em condições como a febre e a dor (FIERS, 1991). A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular variando entre 21 a 28 kDa (VAN SNICK, 1990), produzida por uma variedade de células, incluindo as mononucleares, células T e fibroblastos. Assim como as demais, esta citocina induz a produção de proteínas da fase aguda no fígado, as quais são responsáveis pelo aumento na proteção contra microorganismos, além de modificarem a resposta inflamatória, pois interferem no tráfego celular e na liberação de mediadores inflamatórios (GADIANT e PATTERSON, 1999).

Considerando que diversos genes que codificam proteínas relacionadas à resposta inflamatória encontram-se alterados, nesse estudo, no intestino de fetos com gastrosquise, decidiu-se, por fim, investigar a concentração destas citocinas no intestino dos fetos com gastrosquise. Das citocinas avaliadas no homogenato do intestino, nossos achados revelaram que tanto o grupo sham quanto o grupo com gastrosquise apresentaram uma grande variação na concentração da citocina IL-6 em relação ao grupo controle. Entretanto, um aumento significativo na concentração de IL-6 do grupo gastrosquise foi somente observado em relação ao grupo controle, mas não em relação ao grupo sham. Corroborando este achado, dados clínicos demonstram que níveis elevados de ferritina, IL-6 e IL-8 foram detectados no líquido amniótico de mulheres grávidas que deram à luz a fetos com gastrosquise (MORRISON et al., 1998; GUIBOURDENCHE et al., 2006). Contudo, níveis baixos ou não detectáveis de IL-1 β (FASCHING et al., 2005) e TNF- α (MORRISON et al., 1998) foram observados no líquido amniótico de mulheres grávidas de fetos com gastrosquise. Assim, concluímos que a medida de níveis elevados de IL-6 no intestino de feto (rato) com gastrosquise pode ser utilizada como um possível marcador da gênese desta malformação. Por outro lado, foi observado também na IL-6 um aumento no grupo sham, mostrando que só a manipulação (simulação da cirurgia) já foi capaz de expressar tal citocina.

Conforme estabelecido, o processo inflamatório pode ser altamente influenciado por antiinflamatórios esteróides (AIEs). Além desse papel, alguns AIES são também potentes estimulantes da maturidade intestinal e, desta maneira, de grande utilidade na reversão das lesões intestinais observadas na gastrosquise (YU et al., 2003, 2004). Nesse sentido, Bittencourt et al. (2006) demonstraram que o tratamento com dexametasona reduziu o edema no

intestino de fetos de ratos com gastrosquise. Neste estudo, no entanto, o aumento da atividade da MPO no intestino dos fetos com gastrosquise não foi reduzido na vigência do tratamento das matrizes com a dexametasona. Ainda não estão claros os motivos dessa discrepância, muito embora se deva ressaltar que, ao contrário deste estudo, esses autores não avaliaram de forma quantitativa a resposta inflamatória (ex.: influxo de células inflamatórias, volume de extravasamento plasmático ou atividade de MPO no tecido). Embora a dose aplicada de dexametasona neste estudo baseou-se naquela descrito por Bittencourt et al. (2006), é possível que esta seja capaz de atenuar o aumento de permeabilidade, mas não o influxo de neutrófilos no tecido intestinal dos fetos. Para confirmar tal hipótese estudos futuros utilizando outras vias e doses de glicocorticóides podem auxiliar para maior compreensão dos dados obtidos neste estudo. Ainda, não se pode excluir que o acúmulo de leucócitos observado seja regulado por mecanismos independentes da cascata de mediadores lipídicos, visto que outros inibidores ou bloqueadores não foram utilizados.

Os achados onde os fetos com gastrosquise previamente tratados com a dexametasona exibem uma maior expressão do receptor NK_1 no intestino indica que no evento da gastrosquise o uso de AIE interfere positivamente com a gênese desses receptores em ratos. Os receptores NK_2 , VIP (VPAC-1 e VPAC-2) e vanilóide (TRPV-1) não apresentaram nenhuma alteração com o uso de AINE.

Os AIEs, tais como a dexametasona, causam frequentemente sérios efeitos deletérios quando administrados em dose elevada e por tempo prolongado, incluindo hipertensão e aterosclerose. Segundo achados de Luch et al. (2003), o excesso de glicocorticóides promove aumento da produção de espécies reativas, capazes de afetar a biodisponibilidade do NO. Segundo Lim et al. (2007), baixas concentrações de corticóides aumentam a produção de NO. Foi curioso observar que o intestino dos fetos com gastrosquise tratados com Dx apresentou um aumento significativo da expressão gênica das três isoformas de NOS. Isto é curioso, visto que outros estudos demonstraram que a Dx e outros glicocorticóides reduzem marcadamente a produção de NO gerada por LPS em cultura de células de hepatócitos bem como no cérebro de ratos (ZHANG et al., 2001; WANG et al., 2005).

É possível que a dose de Dx, utilizada neste estudo, seja baixa ou uma consequência indireta do efeito da Dx durante o seu período efetivo, pois não se sabe ao certo por quanto tempo essa dose atuou, se ela realmente foi baixa ou a sinalização das três isoformas da NOS observadas neste estudo foi uma consequência indireta do efeito da Dx durante o seu período efetivo. Portanto a dose de Dx usada neste estudo não está adequada, pois a mesma não foi capaz de reduzir a produção de NO gerada, e sim aumentou.

Curiosamente, um aumento expressivo foi observado na expressão basal de proteínas contendo a 3-NT em intestinos de animais com gastrosquise tratados com dexametasona. Assim, é provável que o aumento na detecção de resíduos de 3-NT (formados pela ação do ONOO^- sobre resíduos tirosina das proteínas) em intestino de fetos com gastrosquise e expostos ao glicocorticoide foi devido à essa única dose administrada.

Observou-se a seguir que fetos com gastrosquise, sob tratamento com Dx exibiram um aumento, na expressão gênica da COX-2, mas não da COX-1 no intestino em relação ao respectivo grupo sem tratamento, evidenciando uma sinalização desse gene, possivelmente devido à baixa dose de Dx administrada, ou uma consequência indireta do período efetivo dessa dose. É possível sugerir que a maior produção de mediadores lipídicos (prostanóides) no tecido intestinal de fetos com gastrosquise, decorrente da maior expressão gênica da COX-2, parece estar associada a uma maior produção de ROS, as quais contribuem para o dano intestinal que culmina numa perda da função motora do aparelho gastrointestinal.

Não foi observada nenhuma alteração com o uso da Dx na SOD-1 e nas três citocinas pró-inflamatórias, devido ao seu uso não interferir na gênese destes marcadores.

5 CONCLUSÕES

1- A indução da gastrosquise em fetos de ratas evocou, após o 3º dia, aumento significativo da atividade da MPO (medida indireta de influxo de neutrófilos) em relação ao controle, mas não do sham, uma redução da expressão gênica do NK₂, aumento da expressão gênica de iNOS (mas não das isoformas constitutivas), COX-2 (mas não COX-1) e no nível de IL-6 e no intestino destes animais em relação aos animais controle.

2- A inflamação intestinal nos fetos com gastrosquise não envolveu, no período avaliado, aumento da expressão de receptores de VIP, Vanilóide, COX-1, nem no nível das citocinas IL-1 β e TNF- α e nem da expressão protéica da SOD-1, podendo ser um indício de que na gastrosquise não há alteração destes marcadores.

3- O tratamento com dexametasona não reduziu o influxo de leucócito, na atividade da MPO nos animais com gastrosquise, devido à lesão desta malformação ser maior e a dose de Dx não foi suficiente para reduzir tal influxo. No intestino dos animais com gastrosquise foi observado um aumento da expressão gênica de NK₁, das três isoformas de NOS, da COX-2 e da expressão protéica da 3-NT.

4- Conclui-se que a indução da gastrosquise em fetos de ratos causa aumento da atividade da MPO, a qual está associada à redução significativa da expressão gênica dos receptores NK₂ bem como à geração de IL-6 e do NO e PGs resultantes do aumento de expressão da iNOS e COX-2, respectivamente, no intestino dos animais. Tais alterações não foram prevenidas pela dexametasona, indicando que este tratamento não foi efetivo para o bloqueio destes eventos.

5- Diante destes achados, podemos especular que a via aferente taquicininérgica (via receptores NK₂) bem como os mecanismos de geração de NO, PGs e IL-6 podem servir de marcadores dessa condição inflamatória no homem, muito embora esta hipótese precisa ser investigada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABUHAMAD, A. Z.; MARI, G.; CORTINA, R. M.; CROITORU, D. P.; EVANS, A. T. Superior Mesenteric Artery Doppler Velocimetry And Ultrasonographic Assessment of Fetal Bowel In Gastroschisis: A Prospective Longitudinal Study. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 176, p. 985-90, 1997.

ADRA, A. M.; LANDY, H. J.; NAHMIAS, J.; GOMEZ-MARIN, O. The Fetus With Gastroschisis: Impact Of Route Of Delivery And Prenatal Ultrasonography. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 174, p. 540-6, 1996.

AGHAJAFARI, F.; MURPHY, K.; MATTHEWS, S.; OHLSSON, A.; HANNAH, M. Repeated Doses of Antenatal Corticosteroids In Animals: A Systematic Review. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 186, n. 4, p. 843-9, 2002.

AKTUG, T.; UCAN, B.; OLGUNER, M.; AKGUR, F. M.; OZER, E.; CALISKAN, S.; ONVURAL, B. Amnio-Allantoic Fluid Exchange For the Prevention of Intestinal Damage in Gastroschisis. Ii: Determination of the Waste Products Removed by Exchange. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, v. 8, p. 326-8, 1998.

ALBERT, A.; JULIA, V.; MORALES, L. Gastroschisis In The Partially Extraamniotic Fetus: Experimental Study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 28, p. 656-9, 1993.

ALBERT, A.; MARGARIT, J.; JULIA, V.; SANCHO M. A.; GALAN X.; LOPEZ, D.; MORALES, L. Morphology and Mucosal Biochemistry of Gastroschisis Intestine In Urine-Free Amniotic Fluid. **J. Pediatr. Surg.**, v. 38, n. 8, p.1217-20, 2003.

ALBERT, A.; SANCHO, M. A.; JULIA, V.; DIAZ, F.; BOMBI, J. A.; MORALES, L. Intestinal Damage in Gastroschisis is Independent of the Size of the Abdominal Defect. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 17, p.116-9, 2001.

ALLEN, R. G.; WRENN, J. R., E. L. Silon As A Sac in the Treatment of Omphalocele and Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 4, p.3, 1969.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEALER, J. F.; GRAF, J.; BRUCH, S. W.; ADZICK, N. S.; HARRISON, M. R. Gastroschisis Increases Small Bowel Nitric Oxide Synthase Activity. **J. Pediatr. Surg.**, v. 31, p. 1043-55, 1045-46, 1996. Discussion.

BENHAM, C. D., GUNTHORP, E. M. J., DAVIS, J. B. TRPV channels as temperature sensors. **Cell Calcium**, v. 33, n.5-6, p.479-87, 2003. Review.

BERGREN, D. R. Prostaglandin involvement in lung C-fiber activation by substance P in guinea pigs. **J. Appl. Physiol.**, v. 100, n.6, p. 1918-27, 2006.

BITTENCOURT, D. G.; BARRETO, M. W., FRANCA, W. M., GONCALVES, A.; PEREIRA, L. A.; SBRAGIA, L. Impact of Corticosteroid on Intestinal injury in A Gastroschisis Rat Model: Morphometric Analysis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 41, n. 3, p. 547-53, 2006.

BLAKELOCK, R. T.; HARDING, J. E.; KOLBE, A.; PEASE, P. W. Gastroschisis: Can the Morbidity Be Avoided? **Pediatr. Surg. Int.**, v. 12, p. 276-82, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7;72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P. P; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

BRAIN, S. D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. **Immunopharmacology**, v. 37, n. 2-3, p. 133-52, 1997. Review.

BUCHMILLER, T. L; SHAW, K.; FONKALSRUD, E. W. Effect of prenatal dexamethasone administration: fetal rabbit intestinal nutrient uptake and disaccharidase development. **J. Surg. Res.**, v. 57, p. 274-9, 1994.

CAĞLAR, M.; HAKGÜDER G, ATEŞ O, OLGUNER M, COKER C, OZER E, AKGÜR FM. Amniotic fluid ferritin as a marker of intestinal damage in gastroschisis: a time course experimental study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, n. 10, p. 1710-5, 2007.

CANTY, T. G.; COLLINS, D. L. Primary Fascial Closure In Infants With Gastroschisis And Omphalocele: A Superior Approach. **J. Pediatr. Surg.**, v. 18, p. 707-12, 1983.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 23-389, n.6653, p. 816-24, 1997.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAÍ, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIF, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 15- 99, n. 21, p. 13926-31, 2002.

CHEN, W.; CHEN, S. L.; XING, F. Q. Brain-derived neurotrophin factor inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.**, v. 24, n. 10, p.1174-6, 2004.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 4, n. 426, p. 517-24, 2003. Suppl. 6966. Review.

CLAUDINE, P. TORFS; PHUNG, K. ; LAM, DONNAM. SCHAFFER, RICHARD J. BRAND. Association Between Mothers' Nutrient Intake and their Offspring's Risk of Gastroschisis. **Teratology**, v. 58, p. 241–250, 1998.

CHORNY, A.; GONZALEZ-REY, E.; VARELA, N.; ROBLEDO, G.; DELGADO, M. Signaling mechanisms of vasoactive intestinal peptide in inflammatory conditions. **Regul. Pept.**, v. 15, n. 137, p. 67-74, 2006. Suppl. 1-2. Review.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 52, n.2, p. 375-86, 2008.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; ESTEVAO-COSTA, J.; FLAKE, A. W.; LEITE-MOREIRA, A. F. A New Fetal Rat Model of Gastroschisis: Development And Early Characterization. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, p. 213-16, 2001.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; ESTEVAO-COSTA, J. Meconium Dependence of Bowel Damage in Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 37, p. 31-4, 2002.

COSTA, S. K.; DE NUCCI G.; ANTUNES E.; BRAIN, S. D. Phoneutria nigriventer spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 27, n. 2-3, p. 223-6, 1997. Suppl. 339.

COSTA, S. K.; BRAIN, S. D.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; DOCHERTY, R. J. Phoneytria nigriventer spider venom activates 5-HT₄ receptors in rat-isolated vagus nerve. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, n. 1, p. 59-64, 2003.

CRAWFORD, R. A.; RYAN, G.; WRIGHT, V. M.; RODECK, C. H. The Importance Of Serial Biophysical Assessment of Fetal Wellbeing in Gastroschisis. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 99, p. 899-902, 1992.

CURRY, J. I.; MCKINNEY, P.; THORTON, J. G.; STRINGER, M. D. The Aetiology of Gastroschisis. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 107, n. 11, p.1339-46, 2000.

DAVIES, B. W.; STRINGER, M. D.: The Survivors of Gastroschisis. **Arch. Dis. Child.**, v. 77, p. 158-160, 1997.

DEANS, K. J.; MOONEY, D. P.; MEYER, M. M.; SHORTER, N. A. Prolonged Intestinal Exposure To Amniotic Fluid does not Result in Peel Formation in Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, p. 975-6, 1999.

DIJKSTRA, G.; VAN GOOR, H.; JANSEN, P. L.; MOSHAGE, H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 5, n. 5, p. 529-36, 2004. Review.

DILSIZ, A.; GUNDOGAN, A. H.; AKTAN, M.; DUMAN, S.; AKTUG, T. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Intestinal Damage in Gastroschisis: A Morphological Evaluation in Chick Embryos. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, p. 1248-52, 1999.

DING-PFENNIGDORFF, D.; AVERBECK, B.; MICHAELIS, M. Stimulation of PAR-2 excites and sensitizes rat cutaneous C-nociceptors to heat. **Neuroreport**, v. 15, n. 13, p. 2071-5, 2004.

DRIVER, C. P.; BRUCE, J.; BIANCHI, A.; DOIG, C. M.; DICKSON, A. P.; BOWEN, J. The Contemporary Outcome of Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, 35, p. 1719-23, 2000.

DUHAMEL, B. Embryology of the exomphalos and allied malformations. **Arch. Dis. Child.**, v. , n. 38, p.142-7, 1963.

DUNN, J. C.; FONKALSRUD, E. W.; ATKINSON, J. B. The Influence of Gestational Age and Mode of Delivery on Infants with Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, p. 1393-5, 1999.

EYSSELEIN, V. E.; NAST, C. C. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. **Z. Gastroenterol. Verh.**, v. 26, p. 253-7, 1991. Review.

FASCHING, G.; HAEUSLER, M.; MAYR, J., SCHIMPL, G.; HAAS, J.; PUERSTNER, P. Can levels of interleukins and matrix metalloproteinases in the amniotic fluid predict postnatal bowel function in fetuses with gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 40, n. 12, p.1887-91, 2005.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 2, p. d12-26, 1997.

FERNYHOUGH, P.; BREWSTER, W. J.; FERNANDES, K.; DIEMEL, L. T.; TOMLINSON DR. Stimulation of nerve growth-factor and substance P expression in the iris-trigeminal axis of diabetic rats--involvement of oxidative stress and effects of aldose reductase inhibition. **Brain Res.**, v. 17, n. 1-2, p. 247-53, 1998. Suppl. 802.

FERRAZ, J. G.; SHARKEY, K. A.; REUTER, B. K.; ASFAHA, S.; TIGLEY, A. W.; BROWN, M. L.; MCKNIGHT, W.; WALLACE, J. L. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology.**, v. 113, n. 1, p. 195-204, 1997.

FLEET, M. S.; DE LA HUNT, M. N. Intestinal Atresia With Gastroschisis: A Selective Approach To Management. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, p. 1323-5, 2000.

FIERS W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. **FEBS Lett.**, v. 22, n. 2, p. 199-212, 1991. Suppl. 285. Review.

FUJINO, K.; TAKAMI, Y.; DE LA FUENTE, S. G.; LUDWIG, K. A.; MANTYH, C. R. Inhibition of the vanilloid receptor subtype-1 attenuates TNBS-colitis. **J. Gastrointest. Surg.**, v. 8, n. 7, p. 842-7; 847-8, 2004. Discussion.

FOREMAN, J. C. Peptides and Neurogenic Inflammation. **Br. Bull.**, v. 43, n. 2, p. 386-400, 1987

GADIENT, R. A.; PATTERSON, P. H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. **Stem Cells**, v. 17, n. 3, p.127-37, 1999.

GASPARI, K. Neuropeptides in The Skin. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 483-498, 2003.

GÓMEZ, N.; DURÁN, G.; LEÓN, C.; ARÉVALO, C.; ROJAS, J.; CASSIS, R.; ROLDÓS, F. Intestinal trichobezoar: report of a case. **Acta Gastroenterol. Latinoam.**, v. 28, n.1, p. 37-9, 1998.

GRAY, S. W.; SKANDALAKIS, J. E. (Ed.). **Embriology For Surgeons**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1972. p. 387-441.

GROSS, K. J.; POTHOUKAKIS, C. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 13, n. 7, p. 918-32, 2007. Review.

GUARINO, N.; OUE, T.; SHIMA, H. Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, p. 1468-73, 2000.

GUIBOURDENCHE, J.; BERREBI, D.; VUILLARD, E.; DE LAGAUSIE, P.; AIGRAIN, Y.; OURY, J.F.; LUTON, D. Biochemical investigations of bowel inflammation in gastroschisis. **Pediatr. Res.**, v. 60, n. 5, p. 565-8, 2006.

GUNTHORPE, M. J.; BENHAM, C. D.; RANDAL, L. A.; DAVIS, J. B. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 4, p. 183-91, 2002. Review.

GUO, W.; SWANIKER, F.; FONKALSRUD, E. W. Effect of Intraamniotic Dexamethasone Administration on Intestinal Absorption in a Rabbit Gastroschisis Model. **J. Pediatr. Surg.**, v. 30, p. 983-7, 1995.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 899, p. 136-47, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HIÁRIO M.O.E., TERRERI T.M., LEN C.A. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cyclooxygenase 2 Inhibitors. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. S206-12, 2006.

HOYME, H. E.; HIGGINBOTON, M. C.; JONES, K. L. The vascular pathogenesis of gastroschisis: intrauterine interruption of omphalomesenteric artery. **J. Pediatr.**, v. 98, p. 228-31, 1981.

HUGHES, D. I.; SCOTT, D. T.; RIDDELL, J. S.; TODD, A. J. Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 8, p. 2035-44, 2007. Suppl. 27.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, v. 61, n. 6, p. 866-79, 1987.

IUCH, T.; AKAIKE, M.; MITSUI, T.; OHSHIMA, Y.; SHINTANI, Y.; AZUMA, H.; MATSUMOTO, T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. **Circ. Res.**, v. 10, n. 1, p. 81-7, 2003. Suppl. 92.

JOBE, A. H.; SOLL, R. F. Choice and Dose of Corticosteroid for Antenatal Treatments. **Am. J. Obst. Gynecol.**, v. 190, p. 878-81, 2004.

JONES, R. C. 3RD.; XU, L.; GEBHART, G. F. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 47, p. 10981-9, 2005. Suppl. 25.

KING, K. A.; HU, C.; RODRIGUEZ, M. M.; ROMAGUERA, R.; JIANG, X.; PIEDIMONTE, G. Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 24, n. 2, p. 101-7, 2001.

KITCHANAN, S.; PATOLE, S. K.; MULLER, R.: Neonatal Outcome Ofgastroschisis and Exomphalos: A 10-Year Review. **J. Paediatr. Child Health**, v. 36, p. 428-430, 2000.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; LAMERS, C. B.; VERSPAGET, H. W.; Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification,

localization, and association with mucosal antioxidants. **J. Pathol.**, v. 201, n. 1, p. 28-36, 2003.

LACEY, S. R.; CARRIS, L. A.; BREYER III, A. J. Bladder Pressure Monitoring Significantly Enhances Care of Infants with Abdominal Wall Defects: A Prospective Clinical Study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 28, p. 1370, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 15, n. 5259, p. 680-5, 1970. Suppl. 227.

LAM, P. K.; TORFS, C. P. Interaction between maternal smoking and malnutrition in infant risk of gastroschisis. **Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.**, v. 76, n. 3, p. 182-6, 2006.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HÅKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, n. 8, p. 793-805, 2004. Review.

LANGER, J. C.; LONGAKER, M. T.; CROMBLEHOLME, T. M.; BOND, S. J.; FINKBEINER, W. E.; RUDOLPH, C. A.; VERRIER, E. D.; HARRISON, M. R. Etiology of Intestinal Damage in Gastroschisis. I: Effects of Amniotic Fluid Exposure And Bowel Constriction In A Fetal Lamb Model. **J. Pediatr. Surg.**, v. 24, p. 992-7, 1989.

LANGER, J. C.; BELL, J. G.; CASTILLO, R. O.; CROMBLEHOLME, T. M.; LONGAKER, M. T.; DUNCAN, B. W.; BRADLEY, S. M.; FINKBEINER, W. E.; VERRIER, E. D.; HARRISON, M. R. Etiology of Intestinal Damage In Gastroschisis, Ii. Timing and Reversibility of Histological Changes, Mucosal Function, and Contractility. **J. Pediatr. Surg.**, v. 25, p. 1122-6, 1990.

LAUSMAN, A. Y.; LANGER, J. C.; TAI, M.; SEAWARD, P.G.; WINDRIM, R. C.; KELLY, E. N.; RYAN, G. Gastroschisis: what is the average gestational age of spontaneous delivery? **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, n. 11, p. 1816-21, 2007.

LEE, L.Y.; WIDDICOMBE, J. G. Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. **Environ. Health Perspect.**, v. 109:585-9. 2001. Suppl 4. Review.

LE MOLI, R.; BALDESCHI, L.; SAEED, P.; REGENSBURG, N.; MOURITS, M. P.; WIERSINGA, W. M. Determinants of liver damage associated with

intravenous methylprednisolone pulse therapy in Graves' ophthalmopathy. **Thyroid**, v. 17, n. 4, p. 357-62, 2007.

LIM, H. Y.; MÜLLER, N.; HEROLD, M. J.; VAN DEN BRANDT, J.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology**, v.122, p. 47-53. 2007. Suppl. 1.

MILJKOVIC, D.; TRAJKOVIC, V. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 15, n.1, p. 21-32, 2004. Review.

MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, n. 2, p. 187-91. 1992. Review.

MOORE, T. C.; STROKES, G. E. Gastroschisis and Onphalocele: Clinical Differences. **Surgery**, v. 33, p. 112-20, 1953.

MOORE, T. C.; COLLINS, D. L.; CATANZARITE, V.; HATCH, E. I. JR. Pre-Term and Particularly Pre-Labor Cesarean Section to Avoid Complications of Gastroschisis. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, p. 97-104, 1999.

MORAND, E. F. Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 19, n. 3, p. 302-7. 2007. Review.

MORRISON, J. J.; KLEIN, N.; CHITTY, L. S.; KOCJAN, G.; WALSHE, D.; GOULDING, M.; GEARY, M. P.; PIERRO, A.; RODECK, C. H. Intra-Amniotic Inflammation In Human Gastroschisis: Possible Aetiology of Postnatal Bowel Dysfunction. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 105, p. 1200-4, 1998.

MUNHOZ, C. D. ; LEPSCH, L. B. ; KAWAMOTO, E. M. ; MALTA, M B ; SÁ-LIMA, L ; AVELLAR, M C ; SAPOLSKY, R M ; SCAVONE, C . Chronic Unpredictable Stress Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Activation of Nuclear Factor- B in the Frontal Cortex and Hippocampus Via Glucocorticoid Secretion. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 3813-3820, 2006.

NAVA, E.; PALMER. R. M.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? **Lancet**, v. 21-28, n. 8782-8783, p.1555-7, 1991. Suppl. 338.

O'NEIL, A. JR.; GROSFELD, J. L. Intestinal Malfunction after Antenatal Exposure of Viscera. **Am. J. Surg.**, v. 127, p. 128-32, 1974.

PAGE, N. M.; DAKOUR, J.; MORRISH, D. W. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 12, n. 7, p. 427-33, 2006.

PHILLIPS, J. D.; KELLY, R.E. JR.; FONKALSRUD, E. W.; MIRZAYAN, A.; KIM, C. S. An Improved Model of Experimental Gastroschisis in Fetal Rabbits. **J. Pediatr. Surg.**, v. 26, p. 784-7, 1991.

PUTNAN, T. C.; EMMENS, R. Pediatric Abdominal Wall Defects. In: Scwhartz, S. I. E. H. (Ed.). *Maingot's Abdominal Operations*. **Norwalk, Conecticut: Appleton e Lange**, 1990. p. 297-313.

RAMÍREZ-PRIETO, M. T.; GARCÍA-RÍO, F.; VILLAMOR, J. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring, **Med. Clin.**, v. 16, n.10, p. 386-96, 2006. Suppl. 127.

REED, K. L.; HEYDRICK, S. J.; AARONS, C. B.; PRUSHIK, S.; GOWER, A. C.; STUCCHI, A. F.; BECKER, J. M. A neurokinin-1 receptor antagonist that reduces intra-abdominal adhesion formation decreases oxidative stress in the peritoneum. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, n. 3, p. G544-51, 2007.

RINEHART, B. K.; TERRONE, D. A.; ISLER, C. M.; LARMON, J. E.; PERRY, K. G. JR.; ROBERTS, W. E. Modern Obstetric Management and Outcome of Infants with Gastroschisis. **Obstet. Gynecol.**, v. 94, p. 112-6, 1999.

ROSS, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 790–801, 2003.

ROBERTS, P. J.; MORGAN, K.; MILLER, R.; HUNTER, J. O.; MIDDLETON, S. J. Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 468-7, 2001.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **Am J. Physiol.**, v. 250, n. 5, p. H815-21, 1986. Part 2.

RUSSO, C.; POLOSA, R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. **Clin. Sci.**, v. 109, n. 2, p. 135-42, 2005. Review.

SANTIAGO-MUNOZ, P. C.; MCINTIRE, D. D.; BARBER, R. G.; MEGISON, S. M.; TWICKLER, D. M.; DASHE, J. S. Outcomes of pregnancies with fetal gastroschisis. **Obstet. Gynecol.**, v. 110, n. 3, p. 663-8, 2007.

SANTOS, C. H.; MARQUES, M.; BEZERRA, R. F.; MATOS, F. M. Síndrome do ceco móvel: manifestações clínicas e avaliação radiológica da mobilidade do ceco e cólon ascendente em pacientes com queixa de constipação crônica. **Rev. Bras. Colo-proctol.**, v. 27, n. 2, p.174-178, 2007.

SCHOLZEN, T.; ARMSTRONG, C.; BURNETT, N.; LUGER, T.; OLERUD, J.; ANSE, L. J. Neuropeptides in the Skin: Interactions Between the Neuroendocrine and the Skin Immune Systems. **Exp. Dermatol.**, v. 7, p. 81-96, 1998.

SIGNORI, L. U.; PLENTZ, R. D.; IRIGOYEN, M. C.; SCHAAN, B. D. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 51, n. 2, p. 222-31, 2007.

SINGER, I. I.; KAWKA, D. W.; SCHLOEMANN, S.; TESSNER, T.; RIEHL, T.; STENSON, W. F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p. 297-306, 1998.

SHAW, K.; BUCHMILLER, T. L.; CURR, M. Impairment Of Nutrient Uptake in a Rabbit Model of Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 29, p. 376-8, 1994.

SHIMIZU, Y.; MATSUYAMA, H.; SHIINA, T.; TAKEWAKI, T.; FURNESS, J. B. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 2, p. 295-311, 2007. Review.

SIMMONS, M.; GEORGESON, K. E. The Effect of Gestational Age At Birth On Morbidity In Patients With Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 31, p. 1060-1, 1996. Suppl. 1062. Discussion.

SKARSGARD, E. D.; CLAYDON, J.; BOUCHARD, S.; KIM, P. C.; LEE, S. K.; LABERGE, J. M.; MCMILLAN, D.; VON DADELSZEN, P.; YANCHAR, N. Canadian Pediatric Surgical Network. Canadian Pediatric Surgical Network: a population-based pediatric surgery network and database for analyzing surgical birth defects. The first 100 cases of gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 43, n. 1, p. 30-4, 2008. Suppl. 34 . Discussion.

SNYDER, C. L. Outcome Analysis For Gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, p. 1253-6, 1999.

SRINATHAN, S. K.; LANGER, J. C.; BLENNERHASSETT, M. G.; HARRISON, M. R.; PELLETIER, G. J.; LAGUNOFF, D. Etiology of Intestinal Damage in Gastroschisis III: Morphometric Analysis of The Smooth Muscle and Submucosa. **J. Pediatr. Surg.**, v. 30, p. 379-83, 1995.

STRINGEL G, FILLER RM. Prognostic factors in omphalocele and gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 14, n. 5, p. 515-9, 1979.

SUITA, S.; OKAMATSU, T.; YAMAMOTO, T.; HANDA, N.; NIRASAWA, Y.; WATANABE, Y.; YANAGIHARA, J.; NISHIJIMA, E.; HIROBE, S.; NIO, M.; GOMI, A.; HORISAWA, M. Changing Profile Of Abdominal Wall Defects In Japan: Results Of A National Survey. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, p. 66-71, 2000.

SWAIN, M. G.; LE, T.; TIGLEY, A. W.; BECK, P. Hypothalamic nitric oxide synthase is depressed in cholestatic rats. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 5, p. G1034-40, 1997. Part 1.

TAN , K. B.; TAN, K. H.; CHEW, S. K.;, YE,O G.S. Gastroschisis and omphalocele in Singapore: a ten-year series from 1993 to 2002. **Singapore Med. J.**, v. 49, n. 1, p. 31-6, 2008.

TIBBOEL, D.; KLUCK, P.; VAN DER KAMP, A. W. The Development of the Characteristic Anomalies found in Gastroschisis – Experimental and Clinical Data. **Z. Kinderchi.**, v. 40, p. 355-60, 1985.

TIBBOEL, D.; VERMEY-KEERS, C.; KLUCK, P.; GAILLARD, J. L.; KOPPENBERG, J.; MOLENAAR, J. C. The Natural History of Gastroschisis During Fetal Life: Development of The Fibrous Coating on The Bowel Loops. **Teratology**, v. 33, p. 267-72, 1986.

TORFS, C. P.; LAM, P. K.; SCHAFFER, D. M.; BRAND, R. J. Association between mothers' nutrient intake and their offspring's risk of gastroschisis. **Teratology**, v. 58, n. 6, p. 241-50, 1998.

VACCARI, S.; LATINI, S.; BARBERI, M.; TET, I A.; STEFANINI, M.; CANIPARI, R. Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-

activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. **J. Endocrinol.**, v. 191, n. 1, p. 287-99, 2006.

VAN CROMBRUGGEN, K.; VAN NASSAUW, L.; DEMETTER, P.; CUVELIER, C. TIMMERMANS JP, LEFEBVRE RA. Influence of soluble guanylate cyclase inhibition on inflammation and motility disturbances in DSS-induced colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 28, n. 1-3, p. 337-49, 2008. Suppl. 579.

VANNUCCHI, M. G.; DE GIORGIO, R.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachykinins distribution in rat ileum during development. **J. Comp. Neurol.**, v. 30, n. 2, p. 153-62, 1997. Suppl. 383.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 253-78, 1990. Review.

XIN, H.; TANAKA, H.; YAMAGUCHI, M.; TAKEMORI, S.; NAKAMURA, A.; KOHAMA, K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 8, n. 3, p. 756-62, 2005. Suppl. 332.

ZHANG, X.; WANG, J. M.; GONG, W. H.; MUKAIDA, N.; YOUNG, H. A. Differential regulation of chemokine gene expression by 15-deoxy-delta 12,14 prostaglandin J2. **J. Immunol.**, v. 15, n. 12, p. 7104-11, 2001. Suppl. 166.

WALLENGREN, J. Vasoactive Peptides in the Skin. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, v.2, p. 49-55, 1997.

WALLENGREN, J.; HAKÁNSON, R. Effects of Substance P, Neurokinin A and Calcitonin Gene-Related Peptide in Human skin and their Involvement in Sensory-Mediated Responses. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 143, p. 267-73, 1987.

WANG, X. Y.; LI, W. Q.; LU, J.; LI, N.; LI, J. S. Mechanism of reduction of albumin expression induced by lipopolysaccharide in rat hepatocytes. **Chin. Med. J.**, v. 20, n. 20, p. 1695-702, 2005. Suppl. 118.

WEINBERG, J. B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. **Immunol. Res.**, v. 22, n. 2-3, p. 319-41, 2000. Review.

WERLER, M. M.; SHEEHAN, J. E.; MITCHELL, A. A. Maternal medication use and risks of gastroschisis and small intestinal atresia. **Am. J. Epidemiol.**, v. 1, n. 1, p. 26-31, 2002. Suppl. 155.

WIDDICOMBE, J. Airway receptors. **Respir. Physiol.**, v. 125, n.1-2, p. 3-15. 2001. Review.

YU, J.; GONZALES-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J. A.; TOVAR, J. A. Effects of prenatal dexamethasone on the intestine of rats with gastroschisis. **J. Pediatr. Surg.**, v. 38, p. 1032-5, 2003.

YU, J.; GONZALEZ-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J. A.; TOVAR, J. A. Local dexamethasone improves the intestinal lesions of gastroschisis in chick embryos. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 19, n. 12, p. 780-4, 2004.