

ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES E ISQUEMIA CEREBRAL. NOVA ESTRATÉGIA PARA NEUROPROTEÇÃO

LUCIANE BUZIN¹
HELENA CIMAROSTI^{2*}
MARIA CAROLINE JACQUES-SILVA³
CHRISTIANNE SALBEGO⁴

1. Bolsista de iniciação científica, aluna do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
2. Farmacêutica-bioquímica, mestre e doutora em Ciências Biológicas – Bioquímica/ UFRGS
3. Farmacêutica-bioquímica, doutora em Ciências Biológicas – Bioquímica/ UFRGS
4. Professora-pesquisadora do Departamento de Bioquímica da UFRGS

*Endereço para correspondência: Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2600 ANEXO (Laboratório 37)
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: hccimarosti@gmail.com

1. ISQUEMIA CEREBRAL

A isquemia cerebral caracteriza-se pela redução severa ou bloqueio completo do fluxo sanguíneo ao cérebro. O cérebro é altamente vulnerável à lesão isquêmica, por ser extremamente dependente do fluxo contínuo de sangue, para suprimento de oxigênio e glicose, devido a sua elevada taxa metabólica. Síndromes isquêmicas têm uma taxa de mortalidade de 30% e são a terceira maior causa de morte em países industrializados (Dirnagl *et al.*, 1999). As principais causas podem ser verificadas no quadro:

Quadro 1. Adaptado de Wyngaarden e Smith, 1990.

CAUSAS DE ISQUEMIA CEREBRAL

1. Doença arterial: (a) aterotrombose das artérias intra e extracranianas; (b) êmbolos provenientes das artérias intra e extracranianas de maior calibre
2. Êmbolos de origem cardíaca
3. Embolia pulmonar: êmbolos paradoxais
4. Cardiopatia, causando redução do fluxo sanguíneo cerebral
5. Infarto lacunar
6. Hipóxia cerebral generalizada
7. Trombose das artérias cerebrais, por vasculopatias não-arterioscleróticas
8. Trombose das artérias cerebrais, por coagulopatias (policitemia, trombocitose)
9. Espasmo arterial cerebral após hemorragia subaracnóide
10. Vasoconstrição arterial cerebral associada à enxaqueca
11. Trombose dos seios venosos ou das veias cerebrais

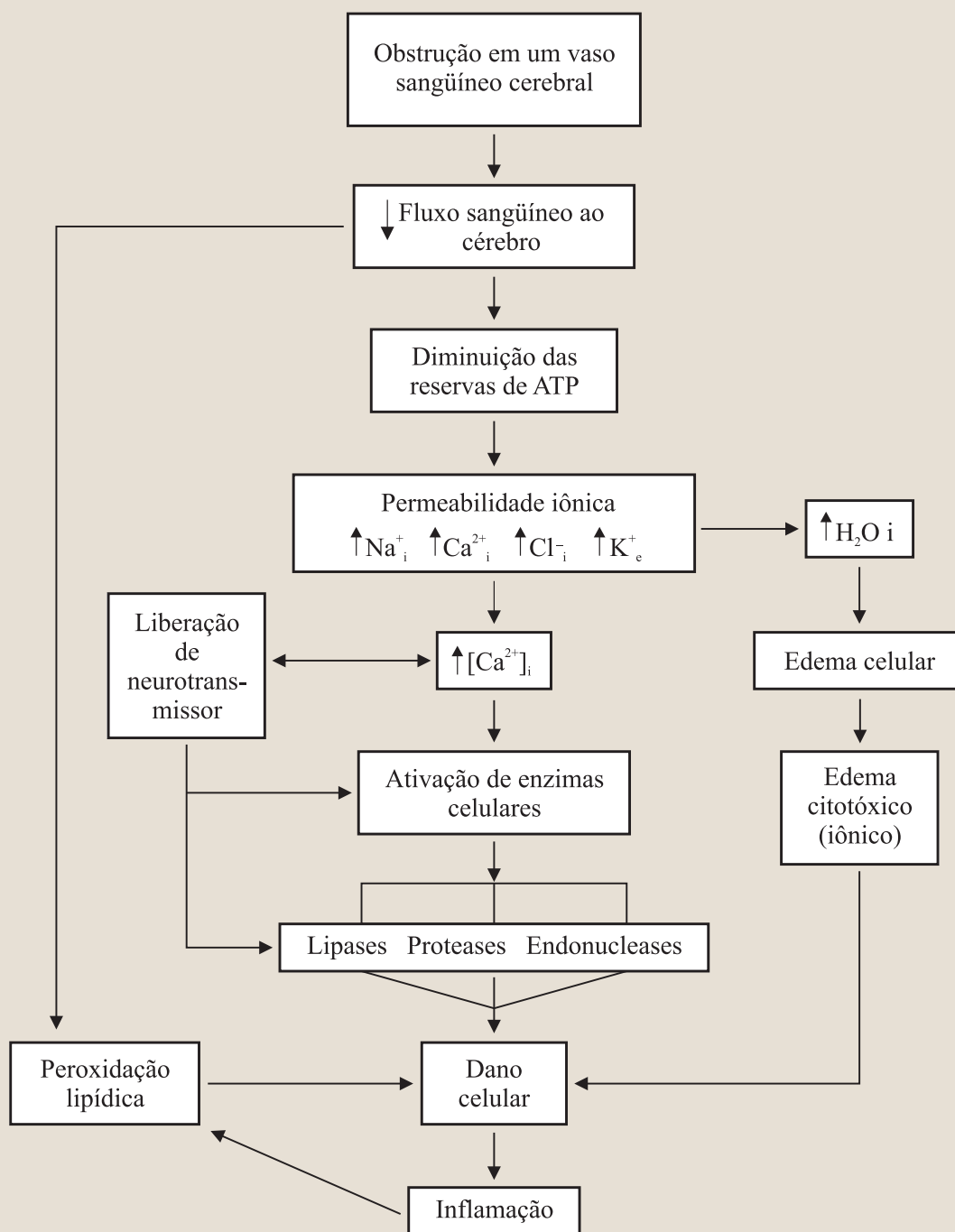
Uma das conseqüências da isquemia cerebral é a neurodegeneração, que pode levar ao comprometimento das aptidões físicas e/ou mentais dos seres humanos.

Apesar de vários trabalhos terem demonstrado o efeito neuroprotetor de drogas em modelos experimentais de isquemia como, por exemplo, lítio e estradiol em cultura organotípica (Cimarosti *et al.*, 2001; Cimarosti *et al.*, 2005) e ácido acetilsalicílico em fatias de cérebro de rato (Moro *et al.*, 2000), não existe até o momento nenhuma terapia voltada para o tratamento e/ou prevenção da isquemia cerebral. Atualmente, o foco de prevenção está em modificar fatores de risco vasculares, tais como hipertensão, tabagismo, estenose da artéria carótida, fibrilação arterial, sedentarismo, diabetes mellitus e dislipidemia (Emsley & Tyrrell, 2002). Normalmente, são usados agentes antiplaquetários, anti-hipertensivos e anticoagulantes na prevenção da reincidência do episódio isquêmico.

Há vários mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de injúria cerebral isquêmica, tais como excitotoxicidade, produção de óxido nítrico, processo inflamatório, produção de radicais livres e morte celular programada (apoptose). Na figura 1, pode-se verificar como estão relacionados alguns destes mecanismos com o processo de morte celular.

Na inflamação desencadeada pela injúria isquêmica, ocorre a produção de citocinas pelas células lesadas, como células microgliciais, astrócitos, células endoteliais e neurônios, que atraem neutrófilos e outros linfócitos para o local onde estes mediarão uma resposta citotóxica (Emsley & Tyrrell, 2002). A elevação da temperatura corporal (febre), característica da

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na lesão isquêmica.
Adaptado de Barone e Feuerstein, 1999.



inflamação, também parece influenciar no episódio isquêmico. A hipertermia que se segue ao infarto isquêmico causa exacerbação da injúria neuronal, aumentando a mortalidade e a morbidade nesses pacientes (Castillo *et al.*, 1998). Os mediadores inflamatórios promovem ainda a expressão de uma enzima produtora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase indutível

(iNOS) (Chung *et al.*, 2001). O óxido nítrico atua como um mediador químico em muitos tecidos, sendo que em pequena quantidade possui efeitos citoprotetores (Rang & Dale, 2004). Entretanto, quantidades excessivas, produzidas através da indução direta da iNOS ou da estimulação excessiva dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) cerebrais, que aumentam a expres-

são da iNOS, podem levar a efeitos tóxicos, como apoptose e formação dos radicais livres peroxinitrito e hidroxila, que lesam biomoléculas (Chung *et al.*, 2001; Rang & Dale, 2004).

O glutamato está relacionado com o processo de excitotoxicidade na isquemia; esta torna os neurônios mais vulneráveis ao glutamato (Danbolt, 2001). Vários mecanismos têm sido propostos para o acúmulo de glutamato na fenda sináptica, tais como liberação do neurotransmissor a partir de estoques intracelulares, hidrólise de N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG) e liberação de glutamato para o citosol por operação reversa dos sistemas de transporte de glutamato, entre outros (Szatkowski *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 2000; Danbolt, 2001). O glutamato ativa os receptores NMDA, AMPA e receptores metabotrópicos, o que causa uma sobrecarga intracelular de cálcio, levando à redução da síntese de ATP e depleção do mesmo, liberação de mais glutamato, ativação de proteases e lipases que lesam a membrana celular, liberação aumentada de ácido araquidônico e ativação da iNOS (Rang & Dale, 2004).

Além dos mecanismos já descritos, também há a ação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na injúria cerebral, tais como o NF- κ B. Este pertence a uma família de fatores de transcrição envolvidos na indução da expressão de uma variedade de genes celulares que regulam a resposta inflamatória, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, fatores de transcrição, proteínas de choque térmico, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β , interleucina-6, óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e molécula intercelular de adesão-1 (ICAM-1) (Bauerle & Henkel, 1994; Baldwin, 1996; Emsley & Tyrrell, 2002).

2. ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados, apresentando basicamente três tipos de efeitos: antiinflamatório (modificação da reação inflamatória), analgésico (redução de certos tipos de dor) e antipirético (redução da temperatura elevada) (Rang & Dale, 2004). Seus principais usos são no tratamento da artrite reumatóide, osteoartrite, artrite induzida pela gota, artrose, dismenorréia e enxaqueca.

Os efeitos dos AINEs devem-se principalmente a sua capacidade de inibir a produção de prostaglandinas através da inibição da primeira enzima envolvida na síntese destes compostos, a sintase dos endoperóxidos das prostaglandinas, também conhecida como ciclo-

xigenase (Goodman & Gilman, 1996). Existem duas isoformas desta enzima, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A primeira é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e desempenha papel na manutenção da homeostase tecidual. Já a segunda isoforma, a COX-2, é induzida pelo processo inflamatório e está relacionada com a produção de mediadores inflamatórios. Mais recentemente foi relatada a descoberta de uma terceira isoforma, a ciclooxigenase-3 (COX-3) (FitzGerald, 2003).

O ácido araquidônico pode ser metabolizado a prostanóides pela via da ciclooxigenase e a leucotrienos pela via das lipoxigenases. Os prostanóides PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂ e o tromboxano A₂ constituem os produtos mais importantes da via da COX. Os AINEs inibem a enzima ciclooxigenase e a produção de prostaglandinas, mas não inibem as vias das lipoxigenases e, portanto, não suprimem a produção de leucotrienos. Com exceção do ácido acetilsalicílico, os AINEs atuam como inibidores competitivos reversíveis da atividade da ciclooxigenase (Goodman & Gilman, 1996).

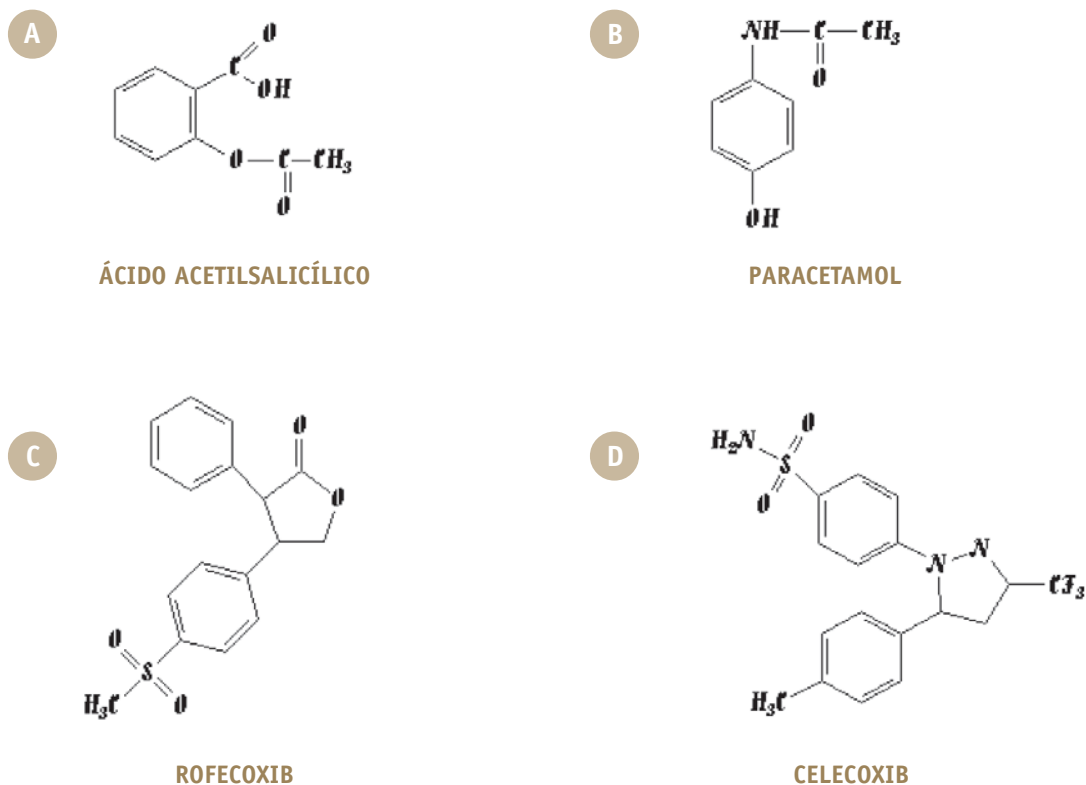
Além dos principais usos clínicos dos AINEs, recentemente eles têm sido alvo de pesquisas como uma possível terapia para isquemia cerebral, não apenas por sua ação antiinflamatória mas por diversos outros mecanismos descritos a seguir. Dentre os AINEs, abordaremos o ácido acetilsalicílico (AAS, inibidor irreversível não seletivo da COX), o paracetamol (inibidor fraco da COX) e os inibidores seletivos da COX-2.

2.1 Salicilatos

O ácido acetilsalicílico (AAS, Figura 2A) tem um amplo espectro de ações farmacológicas por diferentes mecanismos, sendo um dos AINEs mais utilizados. O AAS atua sobre a COX provocando sua inativação irreversível por acetilação de um resíduo de serina, próximo ao sítio catalítico da enzima, o que previne o acesso do ácido araquidônico ao sítio de ação (Catella-Lawson *et al.*, 2001). O AAS, bem como outros anticoagulantes, tem sido usado como uma terapia preventiva à isquemia (Barone & Feuerstein, 1999; FitzGerald, 2003). O AAS atua inibindo a síntese de tromboxano A₂ (TxA₂) via COX-1, prevenindo a atividade vasoconstritora e trombótica deste prostanóide.

O tratamento com AAS ou salicilato de sódio reduziu os níveis de glutamato liberado após injúria isquêmica em modelos de lesão por privação de oxigênio e glicose (POG, "isquemia *in vitro*"), tanto em cultura de neurônios de córtex de rato como em fatias de cérebro de rato (Moro *et al.*, 2000; de Cristóbal *et al.*, 2002). Outros efeitos do AAS foram redução da morte celular,

Figura 2. Estrutura química de alguns AINEs.



verificada pela diminuição da liberação de lactato desidrogenase (LDH – marcador de necrose), diminuição do dano neuronal, inibição da translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo celular, inibição da atividade cálcio-dependente da iNOS e aumento da produção de ATP (Grilli *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2000; de Cristóbal *et al.*, 2002).

Posteriormente, os efeitos do AAS na proteção contra a isquemia cerebral foram observados em um estudo sobre deterioração neurológica precoce (END – *early neurological deterioration*) com 238 pacientes que tiveram um primeiro episódio de infarto isquêmico. A frequência de END foi oito vezes maior em pacientes que não utilizavam AAS: 37,8%. Os que tomavam AAS não tiveram END e apenas 4,9% dos que usavam AAS tiveram END. O tratamento com AAS foi associado a menores níveis de glutamato no fluido cérebro-espinhal destes pacientes (Castillo *et al.*, 2003). Entretanto, não foi verificado o efeito do AAS na redução da hipertermia pós-lesão em um modelo de injúria isquêmica por oclusão da artéria cerebral mediana (Legos *et al.*, 2002).

2.2 Paracetamol

Outro AINE comumente utilizado como analgésico e antipirético é o paracetamol (Figura 2B). Trata-se de um antiinflamatório fraco com reduzido efeito sobre COX-1 e COX-2 e sugere-se que seja um inibidor seletivo de COX-3 (Rang & Dale, 2004). Apresenta vantagens quando comparado a outros AINES por ser menos gastrolesivo, não provocar agranulocitose e agregação plaquetária e não alterar eliminação de ácido úrico. Entretanto, em altas doses pode causar hepatotoxicidade e envenenamento.

Os efeitos do paracetamol na proteção contra a injúria isquêmica foram observados em alguns estudos. Em um modelo animal de isquemia do miocárdio, o paracetamol protegeu a função ventricular, sendo que na ausência da droga a estrutura miofibrilar foi perdida, não sendo restaurada durante o período de recuperação (Merrill *et al.*, 2001; Merrill, 2002). O paracetamol também se mostrou eficiente contra estresse oxidativo, em coração de cobaias submetidos à isquemia, ao reduzir o nível dos radicais livres hidro-

xil e peroxinitrito e o conteúdo de proteínas carboniladas (marcador de dano tecidual) (Merryl *et al.*, 2001; Merryl, 2002). Além disso, reduziu a peroxidação lipídica e a lise celular provocada por radicais t-butilhidroperóxido, peróxido de hidrogênio e ozônio em eritrócitos humanos, e reduziu os níveis de peróxidos produzidos por lesão com peptídeo β -amilóide, em cultura de células PC12 e de neurônios hipocâmpais (Zee *et al.*, 1988; Bisaglia *et al.*, 2002). O paracetamol também reduziu a hipertermia após infarto isquêmico e a indução de NF- κ B em cultura de neurônios hipocâmpais (Dippel, *et al.*, 2001; Bisaglia *et al.*, 2002; Legos *et al.*, 2002).

2.3 Inibidores seletivos da COX-2

Os inibidores seletivos da COX-2 são uma nova estratégia terapêutica, apresentando como vantagem em relação aos AINEs a diminuição do risco de lesão gástrica. Os mais recentes fármacos disponíveis para uso clínico são o rofecoxib (Figura 2C) e o celecoxib (Figura 2D), inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração. Há poucos anos demonstraram eficácia como analgésicos e antiartríticos. Entretanto, efeitos indesejáveis como elevação da pressão arterial e riscos de problemas cardiovasculares foram relacionados ao uso destas drogas (Rang & Dale, 2004).

Em um modelo de isquemia cerebral em cobaias, o tratamento com rofecoxib reduziu a morte na região CA1 do hipocampo de forma dose-dependente, reduziu o aumento de PGE₂ e preveniu a redução dos níveis de glutatona (Candelario-Jalil *et al.*, 2003).

3. CONCLUSÃO

Os AINEs estão entre os fármacos mais utilizados no mundo inteiro, devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Vários estudos demonstram o efeito dos AINEs na proteção contra lesão isquêmica, não somente via inibição de COX, mas por vários outros mecanismos envolvidos no episódio isquêmico. Os AINEs surgem, portanto, como uma nova estratégia terapêutica para prevenção ou redução do dano neuronal provocado pela isquemia. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos na injúria isquêmica e para o desenvolvimento de uma abordagem farmacológica voltada para esta enfermidade, diminuindo a incidência de eventos isquêmicos bem como o dano neuronal associado.

4. AGRADECIMENTOS

As autoras possuíam bolsa de iniciação científica financiada pela FAPERGS e bolsa de doutorado financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, A.S.Jr., The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 14, p. 649-683, 1996.
- BAEUERLE, P.A., HENKEL, T., Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 14, p. 141-179, 1994.
- BARONE, F.C., FEUERSTEIN, G.Z., Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cer. Blood Flow Metab.*, v. 19, p. 819-834, 1999.
- BISAGLIA, M., VENEZIA, V., PICCIOLI, P., STANZIONE, S., PORCILE, C., RUSSO, C., MANCINI, F., MILANESE, C., SCHENTINI, G., Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid β -peptides induced oxidative stress and reduces NF- κ B activation. *Neurochem. Int.*, v. 41, p. 43-54, 2002.
- CANDELARIO-JALIL, E., GONZÁLEZ-FALCÓN, A., GARCÍA-CABRERA, M., ÁLVAREZ, D., AL-DALAIN, S., MARTÍNEZ, G., LEÓN, O.S., SPRINGER, E., Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, v. 86, p. 545-555, 2003.
- CASTILLO, J., DAVALOS, A., MARRUGAT, J., NOYA, M., Timing for fever-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*, v. 29, p. 2455- 2460, 1998.
- CASTILLO, J., LEIRA, R., MORO, M.A., LIZASOAIN, I., SERENA, J., DÁVALOS, A., Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci. Lett.*, v. 339, p. 248-250, 2003.
- CATELLA-LAWSON, F., REILLY, M.P., KAPOOR, S.C., CUCCHIARA, A.J., DEMARCO, S., TOURNIER, B., VYAS, S.N., FITZGERALD, G.A., Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N. Engl. J. Med.*, v. 345, p. 1809-1817, 2001.
- CHUNG, H., PAE, H., CHOI, B., BILLIAR, T.R., Nitric oxide as a bio-regulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 282, p. 1075-1079, 2001.

- CIMAROSTI, H., RODNIGHT, R., TAVARES, A., PAIVA, R., VALENTIM, L., ROCHA, E., SALBEGO, C., An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.*, v. 315, p. 33-36, 2001.
- CIMAROSTI, H., ZAMIN, L., FROZZA, R., NASSIF, M., HORN, A.P., TAVARES, A., NETTO, C.A., Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat organotypic cultures and activates Akt and inactivates Gsk-3beta. *Neurochem. Res.*, v. 30, p. 191-199, 2005. .
- DANBOLT, N.C., Glutamate uptake. *Progress Neurob.*, v. 65, p. 1-105, 2001.
- DE CRISTÓBAL, J., CÁRDENAS, A., LIZASOAIN, I., LEZA, J.C., FERNÁNDEZ-TOMÉ, P., LORENZO, P., MORO, M.A., Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke*, v. 33, p. 261-267, 2002.
- DIPPEL, D.W.J., VAN BREDA, E.J., VAN GEMERT, H.M.A., VAN DER WOUPE, H.B., MEIJER, R.J., KAPPELLE, L.J., KOUDSTAAL, P.J., Effect of paracetamol (acetaminophen) on body temperature in acute ischemic stroke. A double blind, randomized phase II clinical trial. *Stroke*, v. 32, p. 1607-1612, 2001.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M.A., Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *TINS*, v. 22, p. 391-397, 1999.
- EMSLEY, H.C., TYRRELL, P.J., Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 22, p. 1399-1419, 2002.
- FITZGERALD, G.A., COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, p.879-888, 2003.
- GOODMAN & GILMAN, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 1434, 1996.
- GRILLI, M., PIZZI, M., MEMO, M., SPANO, P., Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science*, v. 274, p. 1383-1385, 1996.
- LEGOS, J.J., MANGONI, A.A., READ, S.J., CAMPBELL, C.A., IRVING, E.A., ROBERTS, J., BARONE, F.C., PARSONS, A.A., Programmable microchip monitoring of post-stroke pyrexia: effects of aspirin and paracetamol on temperature and infarct size in the rat. *J. Neurosci. Methods*, v. 113, p. 159-166, 2002.
- MERRILL, G., MCCONNELL, P., VANDYKE, K., POWELL, S., Coronary and myocardial effects of acetaminophen: protection during ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 280, p. H2631-H2638, 2001.
- MERRILL, G.F., Acetaminophen and low-flow myocardial ischemia: efficacy and antioxidant mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 282, p. H1341-H1349, 2002.
- MORO, M.A., DE ALBA, J., CÁRDENAS, A., DE CRISTÓBAL, J., LEZA, J.C., LIZASOAIN, I., DÍAZ-GUERRA, M.J.M., BOSCÁ, L., LORENZO, P., Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacol.*, v. 39, p. 1309-1318, 2000.
- RANG & DALE, *Farmacologia*. Guanabara Koogan, 5ª edição, p. 904, 2004.
- ROSSI, D.J., OSHIMA, T., ATTELL, D., Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, v.403, p. 316-321, 2000.
- SZATKOWSKI, M., BARBOUR, B., ATTWELL, D., Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, v. 348, p. 443-446, 1990.
- WYNGAARDEN, SMITH & CECIL, *Tratado de Medicina Interna*. Guanabara Koogan, 18ª edição, v. 2, p. 2506, 1990.
- YIN, M., YAMAMOTO, Y., GAYNOR, R.B., The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, v. 396, p. 77-80, 1998.
- ZEE, J.V.D., MULDER, G.J., STEVENINCK, J.V., Acetaminophen protects human erythrocytes against oxidative stress. *Chem. Biol. Interac.*, v. 65, p. 15-23, 1988.