

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO EM FARMACOLOGIA/ ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

TENOXICAM: UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NO
TRATAMENTO DAS DOENÇAS VASCULARES CEREBRAIS ISQUÊMICAS

RITA IZABEL MONTEIRO GALVÃO

FORTALEZA - CEARÁ

2003

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RITA IZABEL MONTEIRO GALVÃO

*TENOXICAM: UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NO
TRATAMENTO DAS DOENÇAS VASCULARES CEREBRAIS
ISQUÊMICAS*

*Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Farmacologia / Área de Concentração em
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de mestre.
Orientadora: Profa. Dra. Glauce de Barros Viana*

*UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA – CE
2003*

G173t Galvão, Rita Izabel Monteiro

Tenoxicam: uma possível alternativa terapêutica no tratamento das doenças vasculares cerebrais isquêmicas / Rita Izabel Monteiro Galvão. – Fortaleza, 2003.

132f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce de Barros Viana.

*Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia*

1. Isquemia cerebral 2. Inflamação 2. Tenoxicam. 3. Doença vascular. I Título.

CDD 616.81

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia / Área de Concentração em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Rita Izabel Monteiro Galvão

Dissertação aprovada em / / 2003.

Examinadores:

*Profa. Dra. Glauce de Barros Viana
(Orientadora da Dissertação)*

*Profa. Dra. Geanne de Matos Cunha
Universidade Federal do Ceará*

*Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro
Universidade Federal do Ceará*

A Deus que nunca me abandona, que me busca e me guia.

*À minha querida mãe, por tudo que sou.
Aos meus amados irmãos Isabel, Francisco e João, suportes na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

- à minha orientadora Prof^ª Dra. Glauce de Barros Viana, pelo carinho, amizade, atenção e preocupação dedicados à minha formação;
- à Prof^ª e amiga Geanne de Matos Cunha, presença de luz na minha caminhada;
- ao Prof. Vietla Rao, por seus ensinamentos e conselhos que acalmam e confortam;
- ao Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro, parte integral de minha formação neurológica;
- ao Prof. Pedro Jorge de Caldas Magalhães, pelo incentivo;
- ao Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale, na neurologia, meu mestre;
- ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes, por sua importante colaboração nas análises histopatológicas;
- ao Prof. Marcos Vale, pela cooperação na realização deste trabalho;
- aos bolsistas Emídio, Graziela e João Paulo pela presença amiga, cumplicidade e dedicação aos trabalhos;
- a todos da minha família que me apoiaram nesta caminhada, em especial a meu cunhado Agostinho pelo estímulo constante;
- a Irmã Lídia Pinheiro (*in memoriam*) e Irmã Ana Duarte pelas presenças de força e oração desde que nasci;
- às manas Daniele Teixeira, Marta Kerntopf e Laís Helena, reflexos de verdadeira amizade em minha vida;
- ao amigo Romero Cabral, pela força desde o início;
- à Isabelle Pinte, irmã distante, sempre presente na lembrança;

- *a Gerônimo, por seu amor incondicional;*
- *às secretárias Sílvia, Aura, Rejane, Marta e Joana pela atenção carinhosa;*
- *a Vilanir, por sua meiguice, alegria e dedicação;*
- *à bibliotecária Norma de Carvalho Linhares da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelas normas técnicas utilizadas na edição das referências bibliográficas desta dissertação;*
- *à Dra Artemísia, pela colaboração e apoio;*
- *a Evanir, por seu valioso auxílio no preparo das técnicas bioquímicas;*
- *aos colegas da pós-graduação e do laboratório de neurofarmacologia pela estima e pelo ambiente de agradável convivência;*
- *a todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente no transcorrer desta Tese;*
- *ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro.*

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. A isquemia cerebral	21
1.2. Mecanismos de dano cerebral isquêmico	26
<i>1.2.1. Disfunção mitocondrial e falência energética</i>	26
<i>1.2.2. Glutamato e excitotoxicidade</i>	31
<i>1.2.3. A sobrecarga de cálcio na isquemia cerebral</i>	32
1.3. Reperfusão pós-isquêmica	34
<i>1.3.1. Eventos hemodinâmicos</i>	34
<i>1.3.1.1. Redução de fluxo sanguíneo: o “core” isquêmico e a zona de penumbra</i>	34
<i>1.3.1.2. “No-reflow” ou reperfusão incompleta</i>	37
<i>1.3.1.3. Alterações moleculares da reperfusão</i>	39
<i>1.3.1.4. Óxido nítrico e isquemia cerebral</i>	39
<i>1.3.1.5. Apoptose e isquemia cerebral</i>	42
<i>1.3.1.6. Morte celular mediada por caspases</i>	44
1.4. Inflamação e isquemia cerebral	46
1.5. Citocinas e isquemia cerebral	53
<i>1.5.1. IL-1 (Interleucina-1)</i>	53
<i>1.5.2. TNF-α (Fator de Necrose Tumoral-α)</i>	54
<i>1.5.3. IL-6 (Interleucina-6)</i>	54
<i>1.5.4. TGF-β (Fator transformador-β de crescimento)</i>	54
<i>1.5.5. IFN-γ (Interferon-γ)</i>	55

1.6. Moléculas de adesão celular na isquemia cerebral.....	55
<i>1.6.1. Limitações e perspectivas.....</i>	<i>56</i>
1.7. Quimiocinas na isquemia cerebral.....	57
1.8. Marcadores clínicos de inflamação de parede vascular.....	58
1.9. Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA) através da ação da cicloxigenase (COX) na isquemia cerebral...	59
<i>1.9.1. Produtos da cicloxigenase e do óxido nítrico na inflamação pós-isquêmica.....</i>	<i>61</i>
<i>1.9.2. COX-2 na isquemia cerebral.....</i>	<i>61</i>
1.10. Tenoxicam.....	62
<i>1.10.1. Descrição da droga.....</i>	<i>62</i>
<i>1.10.2. Mecanismo de ação.....</i>	<i>63</i>
<i>1.10.3. Efeitos gerais do TXC.....</i>	<i>63</i>
<i>1.10.4. Farmacocinética.....</i>	<i>64</i>
<i>1.10.5. Indicações e usos.....</i>	<i>64</i>
<i>1.10.6. Contra-indicações.....</i>	<i>65</i>
<i>1.10.7. Interações com outras drogas.....</i>	<i>65</i>
<i>1.10.8. Efeitos teratogênicos.....</i>	<i>66</i>
<i>1.10.9. Efeitos colaterais da terapia com TXC.....</i>	<i>66</i>
1.11. Relevância e justificativa.....	68
2.OBJETIVOS.....	69
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1. Animais.....	72
3.2. Cirurgia.....	72
3.3. Drogas usadas nos experimentos.....	73
3.4. Protocolo experimental.....	74
3.5. Estudo histopatológico.....	74
3.6. Método de coloração pela hematoxilina-eosina.....	75
<i>3.6.1. Corte.....</i>	<i>75</i>
<i>3.6.2. Soluções.....</i>	<i>75</i>
<i>3.6.3. Método.....</i>	<i>76</i>

3.7. Determinação da atividade da mieloperoxidase em hipocampos.....	76
3.7.1. Princípio.....	76
3.7.2. Protocolo experimental.....	76
3.7.3. Soluções reagentes.....	77
3.8. Dosagem de nitrito.....	78
3.8.1. Princípio.....	78
3.8.2. Reagentes utilizados.....	78
3.8.3. Curva padrão.....	78
3.8.4. Protocolo.....	78
3.9. Determinação de monoaminas (DA, NE, 5-HT) E metabólitos (DOPAC, HVA, 5-HIAA) com HPLC.....	79
3.9.1. Método.....	79
3.9.2. Protocolo Experimental.....	80
3.9.3. Soluções Reagentes.....	81
3.9.3.1. Fase Móvel.....	81
3.9.3.2. Ácido Perclórico 0,1 M.....	82
3.9.4. Padrões.....	82
3.10. Determinação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) em HPLC.....	84
3.10.1. Método.....	84
3.10.2. Protocolo Experimental.....	84
3.10.3. Soluções Reagentes.....	85
3.10.3.1. Fase Móvel.....	85
3.10.3.2. Ácido Perclórico 0,1 M.....	85
3.10.4. Padrões.....	86
3.10.5. Solução de derivatização.....	86
3.10.5.1. Preparação do tampão Borato	86
3.10.5.2. Preparação da reação de derivatização (OPA-40 mmol/L)	86

3.11. Determinação dos metabólitos, ATP, lactato e piruvato, através de análise enzimática.....	87
3.11.1. <i>Protocolo Experimental.....</i>	87
3.11.2. <i>Princípio Básico de Análise Enzimática.....</i>	88
3.11.3. <i>Determinação de piruvato.....</i>	89
3.11.3.1. <i>Seqüência da reação.....</i>	89
3.11.3.2. <i>Solução tampão para o ensaio.....</i>	89
3.11.4. <i>Determinação de lactato.....</i>	90
3.11.4.1. <i>Seqüência da reação.....</i>	90
3.11.4.2. <i>Solução tampão para o ensaio.....</i>	90
3.11.5. <i>Determinação de ATP.....</i>	91
3.11.5.1. <i>Seqüência da reação.....</i>	91
3.11.5.2. <i>Solução tampão para o ensaio.....</i>	92
3.11.6. <i>Cálculos dos metabólitos no tecido cerebral....</i>	92
3.12. Análise estatística.....	93
4. RESULTADOS.....	94
4.1. Análise histológica em estriato de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória e os efeitos do tratamento com tenoxicam (10 mg/kg, i.p.).....	95
4.2. Efeitos do tenoxicam no acúmulo de neutrófilos (aumento na atividade da mpo no hipocampo) causado pela oclusão carótidea bilateral seguida de reperfusão.....	98
4.3. Efeito do tenoxicam nos níveis de nitrito/nitrato em homogenato de hipocampo de ratos idosos com isquemia-reperfusão.....	99
4.4. Efeito do tenoxicam em ratos idosos com isquemia-reperfusão, na determinação dos níveis hipocampais de monoaminas.....	102
4.5. Efeitos do tenoxicam nas concentrações de AAES em hipocampus de ratos idosos após isquemia-reperfusão.....	106

4.6. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 1 hora.....	108
4.7. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 24 horas.....	113
4.8. Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 1 hora e 24 horas.....	118
5. DISCUSSÃO.....	122
6. CONCLUSÃO.....	142
7. REFERÊNCIAS.....	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	RNM crânio evidenciando infarto em território da artéria cerebral média esquerda (seta).....	22
Figura 2.	SPECT cerebral evidenciando alteração de fluxo sanguíneo em território de artéria cerebral média direita (seta). Fonte: www.med.harvard.edu.....	23
Figura 3.	Um êmbolo na bifurcação da artéria cerebral média.	25
Figura 4.	Glicólise (Via de Ebden-Meyerhof).	28
Figura 5.	Ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) e fosforilação oxidativa.	29
Figura 6.	Excitotoxicidade do glutamato e a cascata bioquímica no processo de isquemia cerebral, (Romsis,2002).....	30
Figura 7.	Diagrama esquemático demonstrando a cascata de reações evocadas pela despolarização, liberação de glutamato e influxo de cálcio nas células neuronais.	33
Figura 8.	Efeito da redução gradual do fluxo sanguíneo cerebral na função neuronal.	36
Figura 9.	Eventos hemodinâmicos associados à isquemia cerebral e reperfusão.	38
Figura 10.	A enzima óxido nítrico sintetase	42
Figura 11.	Efeitos da isquemia na integridade microvascular.	48
Figura 12.	Seqüência de eventos leucocitários na inflamação	50
Figura 13.	Fisiopatologia da lesão por reperfusão cerebral	51
Figura 14.	Geração de metabólitos de ácido araquidônico e sua participação na inflamação, (Instel, 1999).....	52
Figura 15.	Estrutura química do Tenoxicam.....	62
Figura 16.	Cirurgia com incisão cervical mediana mostrando o clampeamento das artérias carótidas comuns.....	73
Figura 17.	Aparelho de HPLC com detecção eletroquímica.	81
Figura 18.	Modelo de cromatograma padrão das monoaminas	83
Figura 19.	Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência.	87
Figura 20.	Alterações histológicas em corpo estriado de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória.	96

Figura 21.	Efeito do tenoxicam na atividade da MPO em hipocampo de ratos idosos após a oclusão bilateral de carótidas e reperfusão.	100
Figura 22.	Efeitos do tenoxicam sobre a produção de nitrito em homogenato de hipocampo de ratos idosos isquemiados.	101
Figura 23.	Efeitos do tenoxicam sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA em hipocampo de ratos idosos.	104
Figura 24.	Efeitos do tenoxicam sobre os níveis de NE, 5-HT e 5-HIAA em hipocampo de ratos idosos.	105
Figura 25.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora.	110
Figura 26.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora.	111
Figura 27.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora.	112
Figura 28.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 horas.	115
Figura 29.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 hora.	116
Figura 30.	Efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 horas.	117
Figura 31.	Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de reperfusão de 1 e 24 horas.	119
Figura 32.	Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de reperfusão de 1 e 24 horas.	120
Figura 33.	Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de reperfusão de 1 e 24 horas	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alterações histopatológicas em estriato de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória na ausência e presença do tenoxicam (10 mg/kg, i.p.).....	97
Tabela 2.	Concentrações de glutamato e aspartato no hipocampo de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória na presença e ausência de tenoxicam (2,5 e 10 mg/kg, i.p.).....	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AAE	Aminoácidos excitatórios
ADP	Adenosina difosfato
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
AMPA	Propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
APAF-1	Fator ativador de apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hemato-encefálica
CINC	Citocina indutora de quimioatração de neutrófilos
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
CRP	Proteína C reativa
DA	Dopamina
DCVI	Doença cerebral vascular isquêmica
DOPAC	Ácido dihidroxiindolacético
ECA	Enzima conversora de angiotensinogênio
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
FSR	Fluxo sanguíneo renal
5-HT	Serotonina (5-hidroxi-indol-ácido)
5-HIAA	Acido hidroxi-
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HVA	Ácido homovanílico
ICAM-1	Molécula de adesão inter-celular-1
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1- β	Interleucina-1- beta

IL-6	Interleucina-6
LTs	Leucotrienos
LX	Lipoxigenases
MM	Milimolar
μL	Microlitros
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
NE	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PAF	Fator ativador de plaquetas
PET	Tomografia com emissão de pósitron
PGs	Prostaglandinas
RNM	Ressonância nuclear magnética
SNC	Sistema nervoso central
SPECT	Tomografia computadorizada com emissão de fóton isolado
TGF-β	Fator transformador de crescimento-beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TXA2	tromboxano A2
TXs	Tromboxanos
TXC	Tenoxicam
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-celular

RESUMO

TENOXICAM : UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NAS DOENÇAS VASCULARES CEREBRAIS ISQUÊMICAS. Rita Izabel Monteiro Galvão. Orientadora: Prof^a Dra. Glauce Socorro de Barros Viana. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003

O presente estudo avaliou a possível proteção do tenoxicam (txc), um antiinflamatório não esteróide, em um modelo experimental de isquemia-reperfusão. Foram utilizados ratos machos com idade acima de 1 ano Wistar (200-450g), submetidos à oclusão das artérias carótidas comuns por 45 min e decapitados 1h ou 24 h após a isquemia, para a retirada do cérebro e dissecação dos hipocampus . Os animais foram divididos em 5 grupos : 1) Isquemia ; 2) Isquemia + txc 2,5mg/Kg IP; 3) Isquemia + txc 10mg/Kg IP ; 4) Controle falso-operado e 5) controle + txc 10 mg/kg I.P. A análise histológica revelou alteração significativa no grupo 1 em relação ao 4 usando-se uma escala de escores variando de 0 a 3. O uso do txc revela uma tendência para reversão das lesões. A atividade da enzima mieloperoxidase mostrou aumento significativo no grupo 1 em relação ao 4 revertidos para valores de controle com o uso de dose única de txc (2,5 ou 10 mg/kg, i.p.). Os níveis de nitrito também aumentaram no grupo 1 e com o uso do txc houve tendência para atenuação desses valores. Houve aumento nos níveis de dopamina no grupo 1 que foi revertido com o uso do txc em ambas as doses . Os níveis de glutamato se elevaram no grupo 1 mesmo após 24 h de reperfusão que sugere um maior dano da excitotoxicidade nos animais idosos. Os níveis de ATP na reperfusão por 1 h foram inferiores em relação aos de 24 h, refletindo ainda lesão mesmo no início da reperfusão. Os níveis de lactato aumentaram nos grupos 3 e 5 reperfundidos por 24 h em relação aos de 1 h , sugerindo maior dano metabólico nos animais idosos. Os níveis de piruvato diminuíram na reperfusão por 24 h em relação aos de 1 h, refletindo uma normalização da atividade da enzima piruvato-desidrogenase, restabelecendo a taxa metabólica desse substrato. O possível papel neuroprotetor do txc na reversão dos danos secundários à reperfusão na lesão isquêmica é associado à sua ação anti-inflamatória, inibindo a atividade da COX e reduzindo a cascata inflamatória desencadeada no processo isquêmico, com redução da infiltração de células inflamatórias, inibição indireta da produção de citocinas e quimocinas e redução da produção de radicais livres e lesão neuronal. O txc pode ser portanto uma possível alternativa no tratamento de doenças vasculares cerebrais isquêmicas, como uma terapia adjuvante por exemplo ao uso de trombolíticos.

ABSTRACT

TENOXICAM : A POSSIBLE THERAPEUTIC ALTERNATIVE IN THE TREATMENT OF STROKE. Rita Izabel Monteiro Galvão. Supervisor: Dr. Glauce Socorro de Barros Viana. Master's Dissertation in Pharmacology School of Medicine, Federal University of Ceará, 2003

The present work shows effects of tenoxicam (TXC) in rats submitted to transient cerebral ischemia. Male aged Wistar rats (250-450g) were submitted to the both common carotid arteries occlusion with aneurysmal clips to induce ischemia. At the end of 45 min of bilateral carotid arteries occlusion (BCAO), blood flow was restored by releasing the clips and the incision was closed with a single suture. After 1h or 24h of reperfusion, the rats were decapitated, brains dissected and hippocampi removed for measurements of MPO activity, nitrite , monoamine , glutamate/aspartate, ATP, lactate and piruvate levels. The animals were divided in 5 groups (N=4-10): 1) sham-operated, 2) BCAO, 3) BCAO + TXC 2.5mg/kg, 4) BCAO + TXC10mg/kg and 5) sham-operated + TXC 10mg/kg . The TXC administration was made after 45 minutes of BCAO. The histological analysis were made and showed significant changes on group 2 in comparison with group 1 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Dunn' test). The use of TXC showed a tendency of decrease these alterations. The MPO activity in the group 2 was significantly greater than that in the group 1 ($p < 0.0001$, ANOVA and Tukey). The treatment with TXC reduced the MPO activity to control levels ($p < 0.0001$, ANOVA and Tukey). There was increased levels of nitrite in the group 2 in comparison with group 1 ($p < 0.05$), and the treatment with TXC failed to attenuate the ischemic levels. The hippocampal levels of DA were increased after ischemia when compared with group 1 ($p < 0.01$, Anova e Dunnett) and were reverted with TXC in both doses ($p < 0.01$, Anova e Dunnett). Hippocampal level from group 2 of both glutamate and aspartate were higher than group 1 ($p < 0.05$, ANOVA , Dunnett's Test). Ischemia-induced elevations in glutamate and aspartate were not attenuated with TXC . The ATP levels have showed decreases in the group with 1 h of reperfusion in comparison with 24 h . The lactate levels were increased in the 24 h reperfusion's group in relation of 1 h. These results indicated more metabolic damage in aged rats. So, the neuroprotective role of TXC is possibly through the anti-inflammatory action with inhibition of cyclooxygenase activity, and interfering on the inflammatory process of post-ischemic reperfusion. The TXC, therefore, could be a possible therapeutic alternative on stroke treatment like an adjunct drug associated with, for example, a thrombolytic.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A isquemia cerebral

A doença vascular cerebral é definida como uma súbita interrupção do suprimento sanguíneo para parte do cérebro (isquêmica) ou uma súbita ruptura de vaso sanguíneo cerebral com extravasamento de sangue ao redor das células cerebrais (hemorrágica) (NINDS- *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*). Durante o século XIX e início do século XX, houve um crescente interesse na correlação de sinais e sintomas neurológicos encontrados em pacientes com doença cerebrovascular e a região anatômica do dano cerebral evidenciada após a morte. Em meados de 1920, Charles Foix e seus colegas em Paris definiram os territórios de suprimento dos vários vasos nas circulações cerebrais anterior e posterior e observaram os achados em pacientes com infartos nos territórios de várias artérias, (Caplan, 1990).

Entretanto, somente no final do século XX, com uma explosão de avanços técnicos em imagem cerebral através de tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética (Figura 1), angiografia, *doppler* transcraniano, PET e SPECT (sofisticado estudo de medicina nuclear que utiliza um isótopo radioativo e determina alterações no fluxo sanguíneo cerebral diretamente e a atividade metabólica cerebral indiretamente) (Figura 2), é que a informação tornou-se mais clara e disponível, possibilitando conseqüentemente a proliferação de potenciais alvos terapêuticos, através de agentes que alteram a função plaquetária

(aspirina, ticlopidina, clopidogrel), anticoagulantes, endarterectomia de artérias estenosadas ou ocluídas, uso de trombolíticos , angioplastia e drogas neuroprotetoras. O tratamento da doença cerebrovascular, portanto, é baseado na natureza, localização e severidade da lesão, considerando-se a patogênese associada (Caplan & Chung 1999).

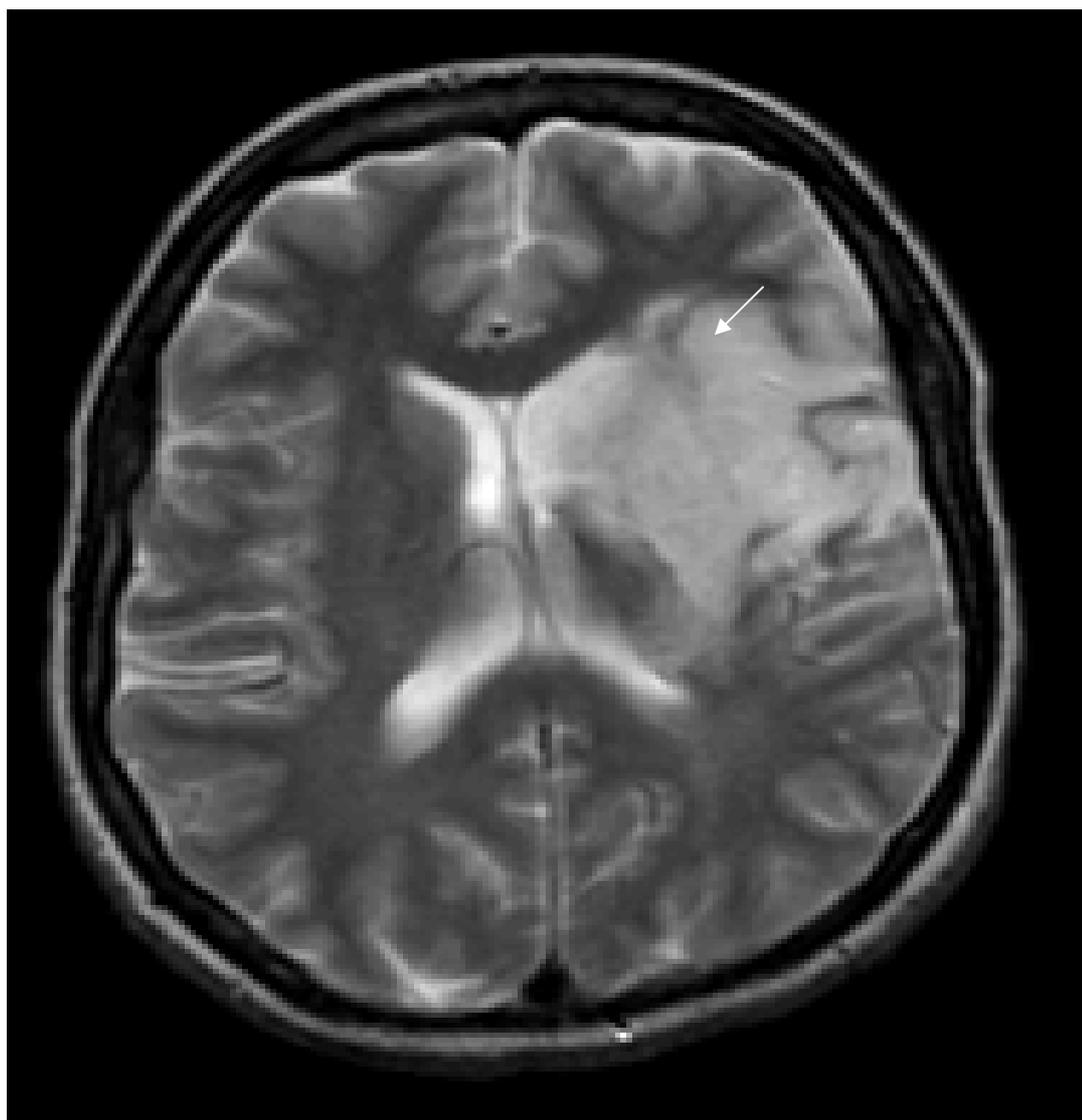


Figura 1. RNM crânio evidenciando infarto em território da artéria cerebral média esquerda (seta). Fonte: www.brainplace.com.

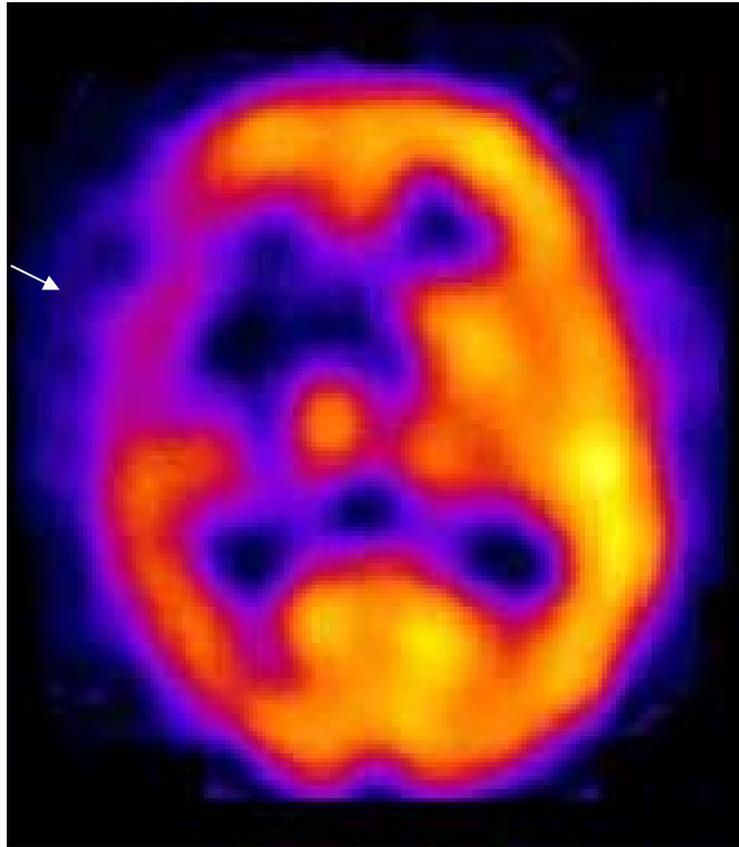


Figura 2. SPECT cerebral evidenciando alteração de fluxo sanguíneo em território de artéria cerebral média direita (seta). Fonte: www.med.harvard.edu.

Apesar das inovações tecnológicas citadas, a doença vascular cerebral é um problema de saúde pública, situando-se entre as três primeiras causas de morte em muitos países, sendo a maior causa de incapacitação no adulto. Acomete principalmente a população acima de 65 anos e mais raramente a infância e adultos jovens, com maior incidência no sexo masculino e a apresentação mais comum é sob a forma de doença vascular cerebral isquêmica que é responsável por cerca de mais de 80% de todas as

doenças vasculares cerebrais, o restante se apresentando sob a forma hemorrágica.

Importantes fatores de risco são associados com a elevada ocorrência de isquemia cerebral e incluem idade avançada, sexo masculino, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, hipercolesterolemia, estenose de artérias carótidas, tabagismo, falta da prática de exercícios, consumo de bebidas alcoólicas e doença cardiovascular (Caplan & Chung, 1999).

A isquemia cerebral pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão para o cérebro, causadas por variados processos: aterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas. A aterotrombose ocorre nas artérias cervico-cranianas e nas pequenas artérias penetrantes intracranianas. Nesta condição, um trombo é formado *in situ* em um estreitamento arterial aterosclerótico que impede o fluxo sanguíneo distal e causa isquemia e resultante infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído. Na embolia cerebral, a artéria cerebral é subitamente bloqueada pelo material embólico que é geralmente um trombo que se desenvolveu mais proximalmente no coração (cardiogênica), aorta ou artérias mais proximais (intra-arterial) (Figura 3). O material embólico também pode ser de origem gasosa, gordurosa, infecciosa (vegetações bacterianas na endocardite) ou de fragmentos calcificados de valvas cardíaca. A outra anormalidade associada à isquemia cerebral é a hipoperfusão sistêmica que é caracterizada por fluxo sanguíneo cerebral criticamente diminuído causado por falência cardíaca ou hipovolemia que leva a uma redução global no fluxo sanguíneo, enquanto a isquemia cerebral de origem

aterotrombótica ou embólica leva a diminuição localizada ou focal do fluxo sanguíneo cerebral.

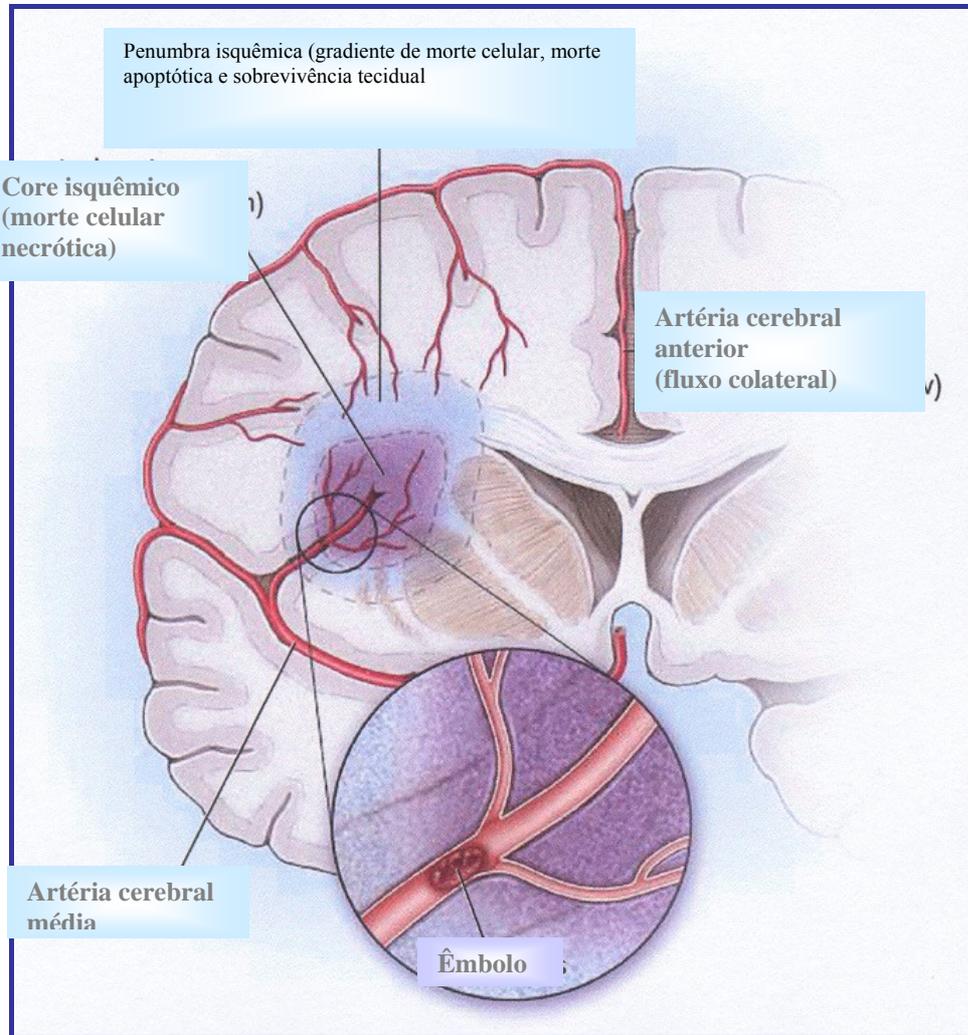


Figura 3. Um êmbolo na bifurcação da artéria cerebral média. O território perfundido por essa artéria e áreas com pouco ou nenhum fluxo colateral estão sujeitas a extrema hipóxia e morte celular necrótica. Na penumbra, onde há algum grau de fluxo sanguíneo colateral, um gradiente de perfusão tecidual estabelece um limiar entre morte celular necrótica, morte celular apoptótica e sobrevivência tecidual, (Friedlander, 2003- traduzido).

1.2. Mecanismos de dano cerebral isquêmico

1.2.1. Disfunção mitocondrial e falência energética

O cérebro humano constitui somente 2% do peso corporal, mas o processo de energia necessária para a função cerebral é responsável por cerca de aproximadamente 25% da utilização da glicose corporal total e por cerca de 20% do consumo de oxigênio do organismo. No cérebro, sob quantidades adequadas de oxigênio, o ATP é formado a partir da glicose, que é o substrato principal para o metabolismo cerebral (uma molécula de glicose resulta em 38 moléculas de ATP) com água e CO₂ como produtos finais do ciclo do ácido tricarboxílico da fosforilação oxidativa associada (Figuras 4 e 5). Se a glicólise ocorre sob condições anaeróbicas, como por exemplo durante a isquemia cerebral, o ATP é reduzido (2 moléculas de ATP para 1 molécula de glicose) e a glicose é convertida a piruvato que, então, é convertido a lactato, resultando em acidose intra e extracelular (Romsis, 2002) O metabolismo da glicose pode proceder para glicólise, resultando na produção de lactato sem consumo de oxigênio ou a glicose pode ser incorporada em glicogênio, constituinte essencial para macromoléculas tais como glicoproteínas e glicolipídios presentes em células neurais ou pode ainda entrar nas vias metabólicas que resultam na síntese de importantes neurotransmissores como o glutamato (Magistretti, 1999).

A isquemia leva, portanto, ao comprometimento do citocromo mitocondrial com lentificação ou parada no transporte de elétrons. Isto tem duas conseqüências imediatas: a produção de ATP diminui e o piruvato é reduzido a lactato com liberação de H⁺ produzindo assim acidose. Portanto, o

evento fisiopatológico primário no processo de isquemia cerebral é a disfunção mitocondrial. (Siesjö, 1996).

A conseqüente depleção de energia resulta na falência da bomba Na^+/K^+ ATPase e de outras bombas iônicas dependentes de energia, levando à despolarização da membrana neuronal (despolarização anóxica), perda da função sináptica e da condutividade por desequilíbrio nos gradientes iônicos e influxo de Na^+ causando edema celular. A velocidade rapidez com que a despolarização anóxica ocorre depende da severidade e duração do evento isquêmico e, associada a dano estrutural adicional pela ação do glutamato e influxo de Ca^{2+} nos neurônios, leva à morte neuronal (Figura 6). A falência energética é provavelmente o mecanismo predominante de morte celular na região do *core* isquêmico, (Iadecola, 1999), (Figura 3).

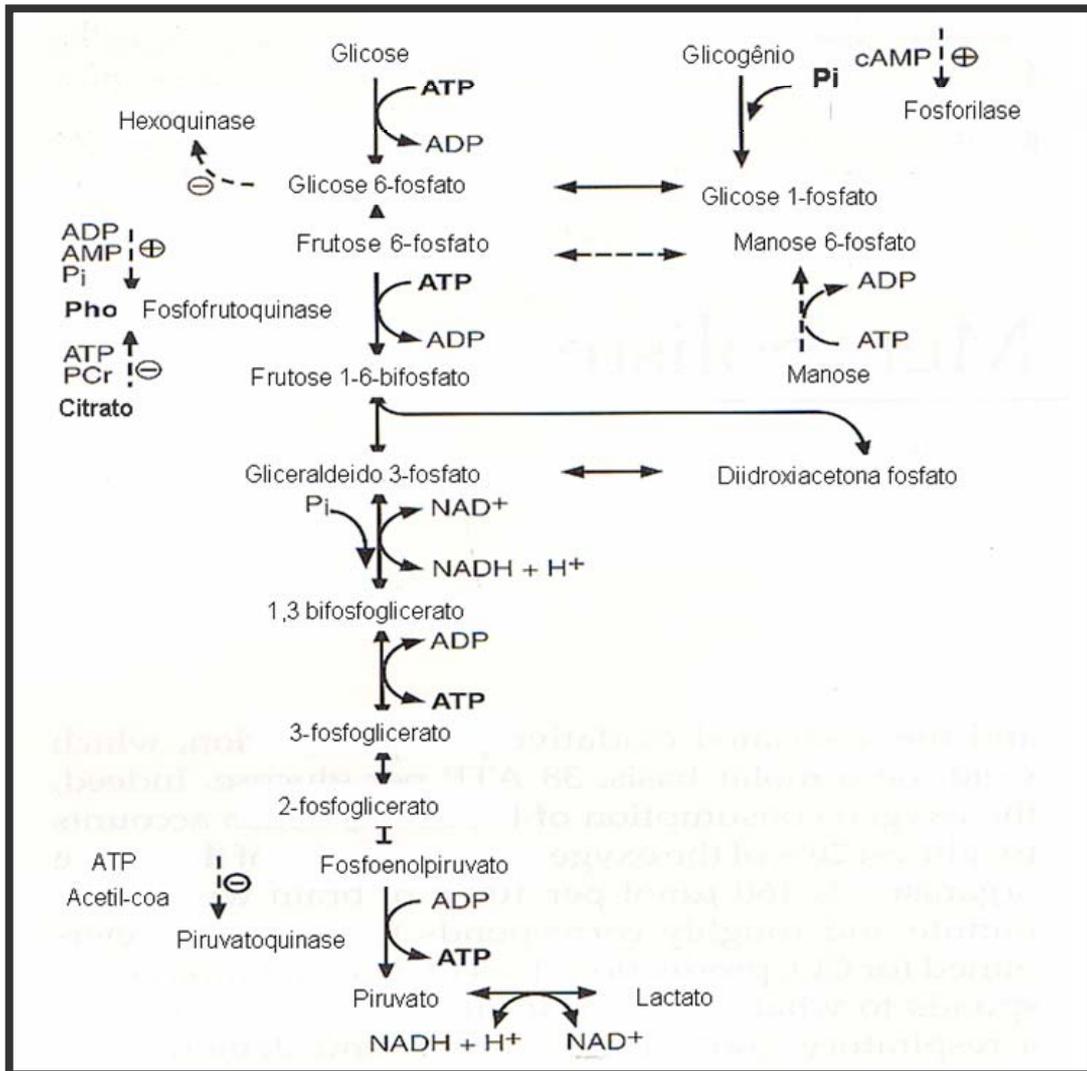


Figura 4. Glicólise (Via de *Ebden-Meyerhof*). A fosforilação da glicose é catalisada pela enzima hexoquinase, com a produção de glicose-6-fosfato e ADP através do consumo de ATP. A glicose deve ser fosforilada para ingressar no processo de glicólise ou ser armazenada como glicogênio. É ainda catalisada pela fosfofrutoquinase com novo consumo de ATP. Segue a ação da piruvatoquinase para a formação final de piruvato com produção de ATP. O piruvato formado permanece em equilíbrio com o lactato através da ação da lactato desidrogenase, (Magistretti, 1999- traduzido).

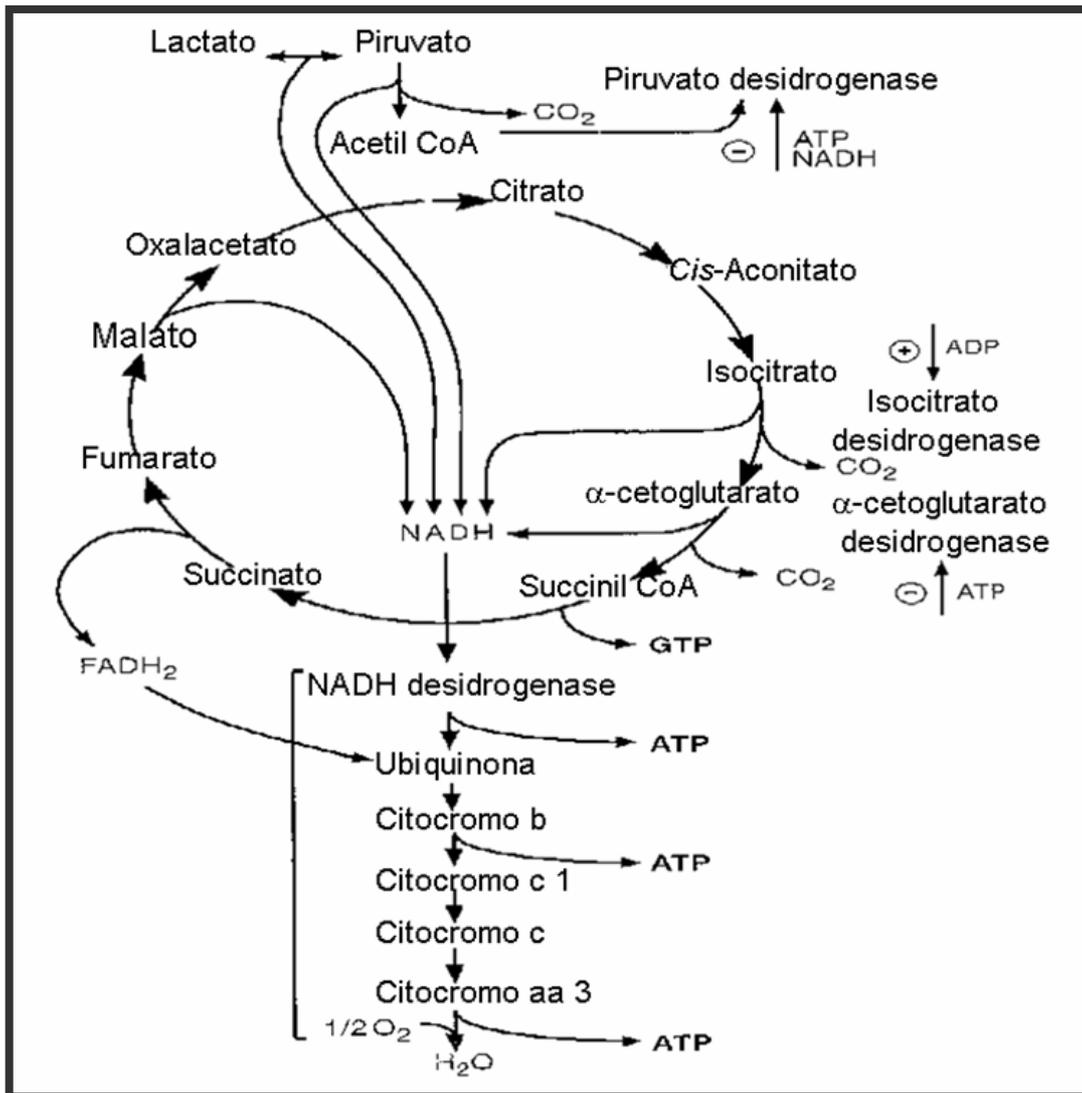


Figura 5. Ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) e fosforilação oxidativa. O piruvato que entra no ciclo é controlado pela atividade da piruvato desidrogenase que é inibida por ATP e NADH. Duas outras etapas no ciclo são controladas por isocitrato e α -cetoglutarato desidrogenases, cujas atividades são controladas pelos níveis de fosfatos de alta energia, (Magistretti, 1999- traduzido).

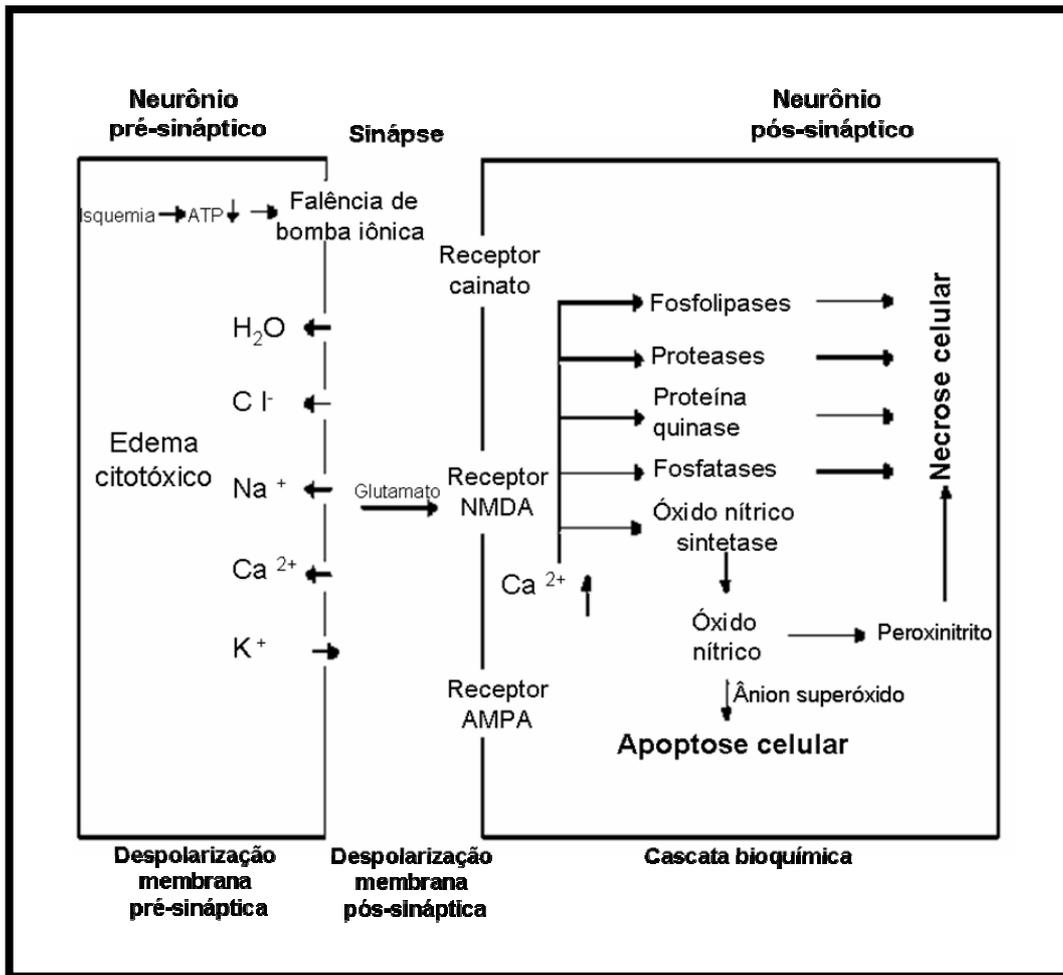


Figura 6. Excitotoxicidade do glutamato e a cascata bioquímica no processo de isquemia cerebral, (Romsis,2002).

1.2.2. Glutamato e excitotoxicidade

O glutamato, principal neurotransmissor cerebral, é responsável por muitas funções neurológicas fisiológicas, incluindo cognição, memória, movimento e sensação e produz uma resposta excitatória (despolarizante). Esta resposta é gerada conseqüente a interação do glutamato com receptores glutamatérgicos divididos em metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos ativados pelo glutamato são os receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), receptores cainato e receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (Figura 6). A ativação de receptores AMPA e cainato (também chamados não-NMDA) resulta na abertura de canais de Na^+ e K^+ enquanto o receptor NMDA promove a abertura de canais de Ca^{2+} . O receptor NMDA é bloqueado por Mg^{2+} na vigência de potenciais de membrana em repouso normais. A abertura destes canais leva à despolarização da membrana e à remoção do bloqueio do Mg^{2+} permitindo assim a ligação do agonista, (Sims & Zaidan, 1995).

Na isquemia cerebral, a despolarização da membrana pré-sináptica é mediada por canais de Na^+ voltagem-dependentes e libera glutamato no espaço extracelular, ativando receptores glutamatérgicos (tipo NMDA ou AMPA) nos neurônios pós-sinápticos. Isto traz como conseqüência um excessivo influxo de Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- e água nos neurônios e um efluxo de íons K^+ , promovendo edema celular, acidose e produção de espécies reativas de oxigênio, ocasionando a morte neuronal, processo conhecido como excitotoxicidade (Figura 6). Como o glutamato é altamente neurotóxico no espaço extracelular ele é ativamente removido da fenda sináptica e restaurado para as células pré-sinápticas. Este mecanismo é também

prejudicado durante a isquemia, contribuindo para um aumento persistente das concentrações de glutamato extracelular, (Romsis,2002). A ativação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes através da ação do glutamato contribui para o aumento do Ca^{2+} intracelular que, por sua vez, ativa enzimas tais como proteína-quinases, fosfatases, endonucleases com formação de radicais livres e dano à citoarquitetura neuronal, (Sims & Zaidan, 1995), (Figura 6).

1.2.3. A sobrecarga de cálcio na isquemia cerebral

Com o processo isquêmico, elevadas concentrações extracelulares de glutamato, como já citado, causam a despolarização da membrana neuronal que leva à captação celular de íons Ca^{2+} , resultando em um aumento das concentrações de Ca^{2+} livre citosólico. Com valores de Ca^{2+} aumentados no processo isquêmico, ocorre a ativação de uma cascata de reações, muitas das quais são de natureza potencialmente adversa, que direta ou indiretamente contribuem para o dano celular: lipólise, proteólise, fosforilação/desfosforilação, desarranjo de microtúbulos e formação de radicais livres. A ativação cálcio-induzida de fosfolipases A2 e C leva à liberação de ácidos graxos livres, incluindo ácido araquidônico (AA), de fosfolipídios de membrana. As enzimas envolvidas no metabolismo do AA, cicloxigenase (COX) e lipoxigenase, então geram espécies reativas de oxigênio que agravam o dano celular. Outra enzima de relevância ativada via Ca^{2+} é a óxido nítrico sintetase (NOS) que produz óxido nítrico (NO) e radicais livres decorrentes da reação do NO com radicais peróxido e hidroxil. (Figura 7) O acúmulo subsequente de cálcio mitocondrial pode levar a ativação de um poro proteínico de transição de permeabilidade mitocondrial na membrana mitocondrial interna (poro MPT), levando à liberação de mais Ca^{2+} , Mg^{2+} e outras moléculas com peso molecular de até

1,5 kD do compartimento mitocondrial. Neste processo, a mitocôndria apresenta diminuição no potencial de membrana (despolarização), edema osmótico, cessação da produção de ATP e produção de espécies reativas de oxigênio, (Kristián & Siesjö, 1998).

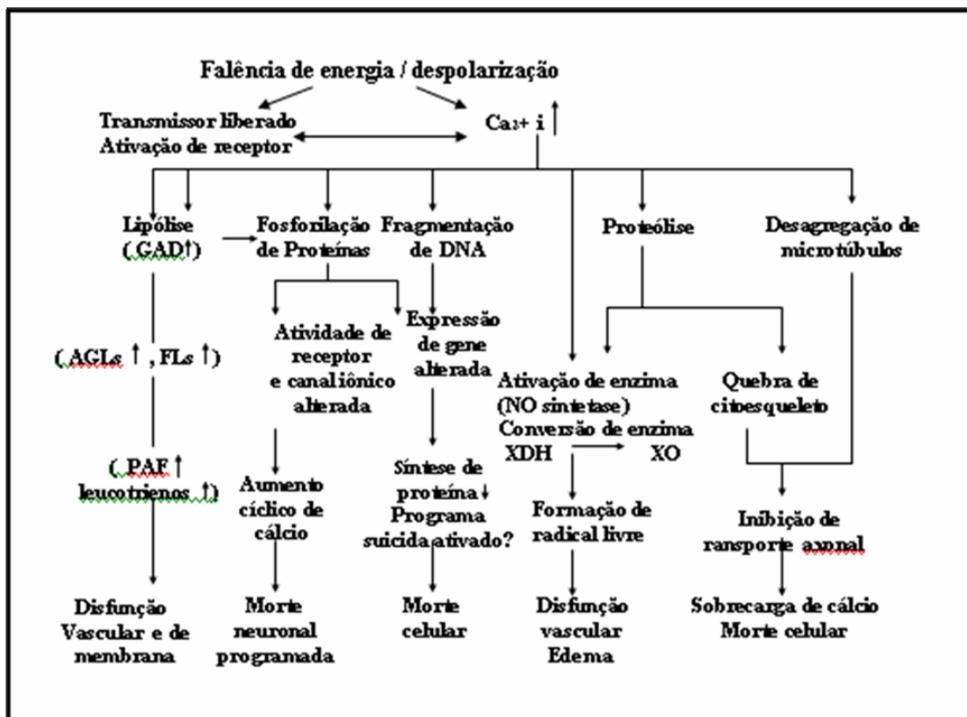


Figura 7. Diagrama esquemático demonstrando a cascata de reações evocadas pela despolarização, liberação de glutamato e influxo de cálcio nas células neuronais. Fonte: SiesjöK. & Siesjö, 1996 (Traduzido).

1.3. Reperusão pós-isquêmica

1.3.1. Eventos hemodinâmicos

1.3.1.1. Redução de fluxo sanguíneo: o “core” isquêmico e a zona de penumbra

Diante de um episódio de doença cérebro-vascular isquêmica, observa-se que a redução do fluxo sanguíneo cerebral através do território isquêmico não é homogênea, mas é maior no centro da lesão, região denominada *core* isquêmico. A isquemia torna-se progressivamente menos severa quanto mais distante do *core* isquêmico, até que o fluxo retorne ao normal em regiões supridas por artérias adjacentes que não estão ocluídas. Esta região na periferia do território isquêmico é então chamada penumbra isquêmica. A manutenção relativa da perfusão nessa região é o resultado de fluxo colateral originado de território não-isquêmico adjacente, (Iadecola, 1999), (Figura 3).

A penumbra isquêmica é uma região eletrofisiologicamente dinâmica e metabolicamente instável, porque, a despeito do declínio crítico da perfusão na zona de penumbra, o nível de metabolismo de glicose tende a ser mantido em níveis normais (Belayev et al., 1997). A manutenção dessa taxa de fosforilação de glicose normal na penumbra em face a perfusão criticamente diminuída sinaliza estresse metabólico severo para o tecido. Tipicamente, se observam despolarizações peri-infarto. As despolarizações celulares são associadas com efluxo de íons K^+ das células e influxos de Na^+ e Ca^{2+} e para restaurar esses gradientes iônicos, energia é consumida, (Siesjö & Siesjö, 1996). Medidas bioquímicas confirmam a diminuição nos níveis de ATP como demonstrado por Swanson e cols, (1997).

A penumbra progride, então, para zona de lesão irreversível em poucas horas a menos que reperfusão seja iniciada e terapia neuroprotetora seja administrada (Back et al., 1998). Em termos hemodinâmicos, esta é uma região tecidual na qual o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é reduzido a um grau intermediário, isto é, para 20 a 40% dos valores controle. O *core* isquêmico, por definição, consiste daquelas porções da zona isquêmica em que o FSC é mais severamente reduzido para zero a 20% do controle (Belayev et al., 1997; Iadecola, 1999), (Figura 8).

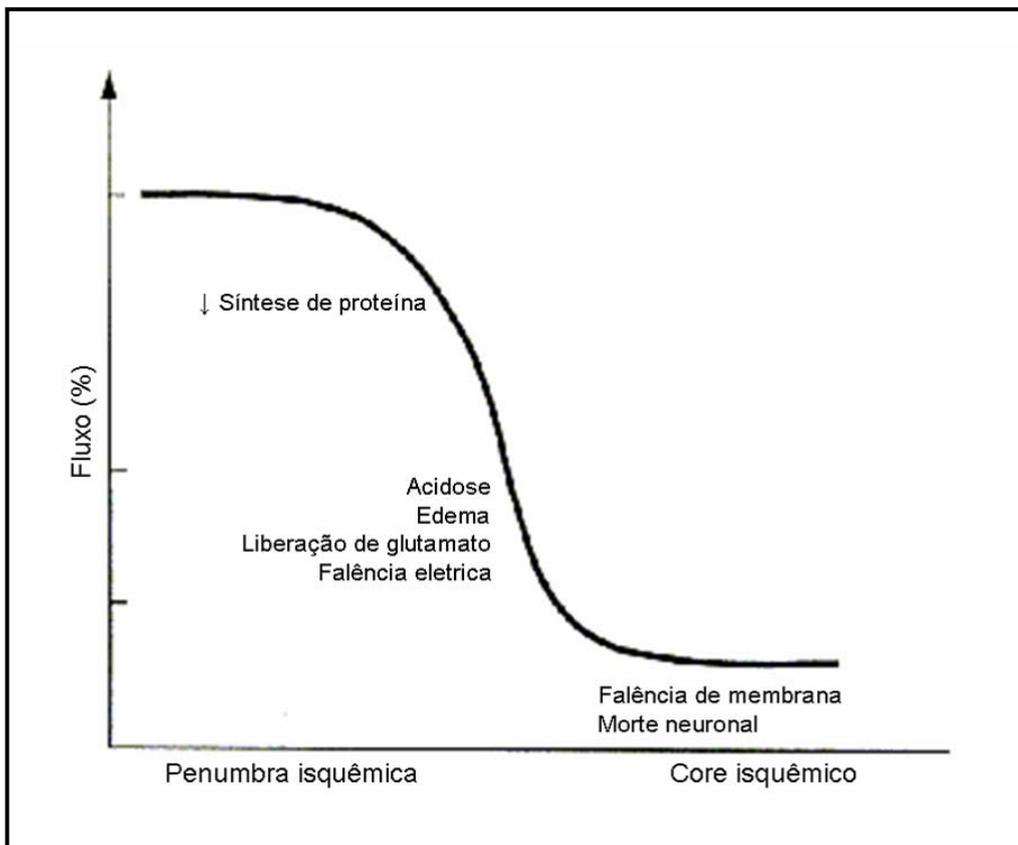


Figura 8. Efeito da redução gradual do fluxo sanguíneo cerebral na função neuronal. A primeira função celular a ser afetada pela isquemia é a síntese de proteínas. A síntese de proteína não é reduzida indiscriminadamente, mas é redirecionada à síntese de produtos de genes específicos (expressão de genes seletiva). Reduções do fluxo abaixo de 50% das taxas normais afeta a habilidade dos neurônios para disparar potenciais de ação e reter neurotransmissores. A homeostase do pH da água também são afetadas. A redução do fluxo para cerca de 20% do normal resulta em perda de gradientes iônicos e elétricos (despolarização anóxica) e morte neuronal, (Iadecola, 1999).

1.3.1.2. “*No-reflow*” ou *reperfusão incompleta*

Se a oclusão arterial é liberada, o fluxo sanguíneo cerebral retorna ao território isquêmico. Inicialmente, há uma fase de fluxo aumentado (hiperemia pós-isquêmica) seguida por um período longo de fluxo reduzido (hipoperfusão pós-isquêmica ou “*no-reflow*”).

A liberação de metabólitos vasoativos do cérebro isquêmico e a viscosidade diminuída contribuem para a hiperemia pós-isquêmica. Há uma multiplicidade de fatores associados à hipoperfusão pós-isquêmica como, por exemplo, a depressão metabólica pós-isquêmica e a obstrução da microvasculatura cerebral durante o período de reperfusão. Esses eventos resultam em vasoparalisia, e portanto, numa reatividade e autoregulação da vasculatura cerebral prejudicada, (Iadecola, 1999), (Figura 9). O prejuízo do fluxo sanguíneo cerebral também decorre do aumento da pressão intracraniana durante a reperfusão que pode levar à compressão vascular e perfusão tecidual diminuída, (Romsis, 2002).

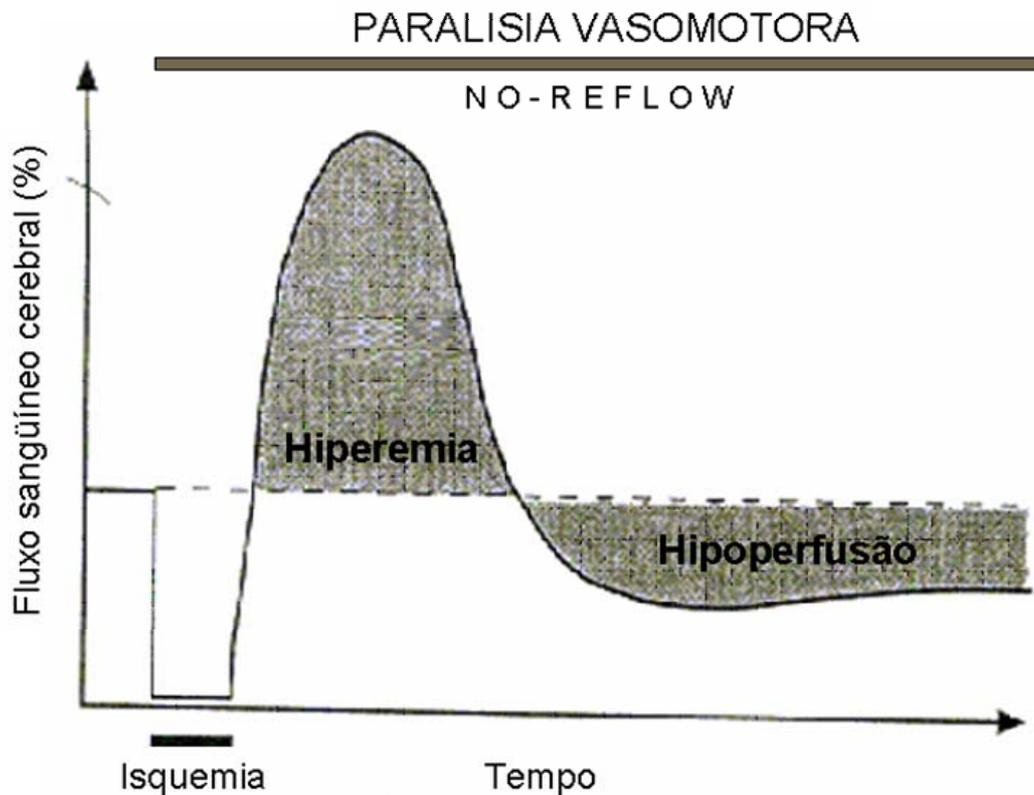


Figura 9. Eventos hemodinâmicos associados à isquemia cerebral e reperfusão.

Isquemia resulta em severa redução do fluxo sanguíneo. O restabelecimento do fluxo sanguíneo produz uma fase inicial de hiperemia seguida por um período no qual o fluxo é reduzido abaixo de valores pré-isquêmicos (hipoperfusão). Como o resultado de oclusões microvasculares difusas, o território isquêmico não é inteiramente reperfundido (*No-reflow*). Durante a fase de reperfusão, a reatividade vascular é reduzida (vasoparalisia), (Iadecola, 1999).

1.3.1.3. Alterações moleculares da reperfusão

A alteração na transdução de sinais começa com o estímulo de receptores glutamatérgicos e de fatores de crescimento e continua com a geração de segundos mensageiros que modulam a sinalização celular por influenciar fatores transcripcionais citosólicos. Alguns destes fatores são enzimas como; quinases e fosfatases que, ativadas pela ação do Ca^{2+} , óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, regulam a expressão gênica e a síntese de proteínas e que, de forma continuada, levam à apoptose e morte celular. Com a reperfusão, a reposição do suprimento de oxigênio desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio que estão envolvidas na regulação gênica, (Morley et al.,1994).

No processo isquêmico, portanto, de acordo com os diferentes níveis de perfusão como já vistos, existem zonas com diferentes padrões de expressão gênica, (Ginsberg, 2003).

1.3.1.4. Óxido nítrico e isquemia cerebral

O óxido nítrico (NO) é um gás derivado da L-arginina numa reação catalisada pela enzima óxido-nítrico sintetase (NOS). A enzima NOS converte L-arginina e O_2 em NO e L-citrulina numa reação de oxidação que requer NADPH como um cofator (Figura 10). Três classes de NOS têm sido caracterizadas: duas delas são expressas constitutivamente e ativadas pela Ca^{2+} -calmodulina formada quando Ca^{2+} intracelular é elevado. As formas constitutivas são designadas neuronal (NOSn) e endotelial (NOSe), com base no seu sítio de origem. A 3ª classe é a forma induzível, cujos níveis são

marcadamente aumentados por transcrição e síntese de proteínas em resposta a um estímulo celular. É a forma mais proeminente em macrófagos estimulados por citocinas, (Deuth & Roth, 1999). A expressão de NOSi também tem sido demonstrada em neutrófilos e vasos sanguíneos em infartos cerebrais de pacientes que morreram após 24 horas de isquemia cerebral, (Foster, 1999).

Já é largamente conhecido que a produção de NO é elevada no processo de isquemia-reperfusão e que o NO tem um papel importante no dano neuronal através da formação de radicais livres, reagindo com ânions superóxido produzidos concomitantemente e assim gerando compostos altamente tóxicos tais como peroxinitrito e radicais hidroxil. A NOSi também pode ser envolvida na reação inflamatória que segue à isquemia cerebral. Dados indicam que a produção de NO pela ação da NOSi em neutrófilos é um dos mecanismos pelos quais a inflamação pós-isquêmica causa dano cerebral, (Iadecola, 1999). Foi demonstrado ainda que citocinas, tais como; TNF- α , IL-1 β induzem a expressão de NOSi em células inflamatórias e em microvasos e que, através das alterações no estado redox vascular após a reperfusão, fatores transcricionais em células vasculares são ativados e, diretamente ou via produtos de genes induzidos, promovem a expressão de NOSi, (Iadecola et al., 1996) A atividade da NOSi também foi evidenciada *in vitro* em fatias de cérebros de ratos submetidas a um modelo de privação de oxigênio e glicose, (De Alba et al., 1999).

Mas o papel do NO nos mecanismos de isquemia cerebral é multifacetado. Imediatamente após a isquemia, o NO é benéfico ao tecido porque promove vasodilatação, inibe a agregação plaquetária e aumenta o

fluxo para regiões de penumbra com risco de infarto, (Morikawa et al., 1992; Zhang et al., 1994; Dawson et al., 1994). Entretanto, o NO tem sido implicado como mediador tanto da apoptose, (Tseng et al., 1997) como da necrose neuronal induzidas por glutamato, (Dawson et al., 1994). Após 6 horas de isquemia, NO produzido em grandes quantidades pela indução de NOSi no tecido pós-isquêmico é também patogênico para o cérebro e contribui para a progressão do dano tecidual, (Iadecola et al., 1995; Zhang et al., 1996).

Em condições fisiológicas, as concentrações de NO são controladas pelos tipos neuronal e endotelial de NOS expressos constitutivamente. Contudo, a concentração de NO pode aumentar rapidamente pela hiperativação da NOS em desordens como a isquemia-reperfusão, (Tseng et al., 1997; Tseng et al., 1999). Um novo mecanismo intrigante de modulação de NO é a supressão da transcrição do gene que codifica a NOSi pelo próprio NO, gerando uma alça autoregulatória. Esse efeito inibitório do NO na expressão do gene codificador da NOSi tem sido atribuído à inativação NO-mediada do fator nuclear transcripcional κ B (NF- κ B), (Katsuyama et al., 1998). A concentração de NO é, portanto, um fator chave em controlar a indução ou supressão da expressão da NOSi. Entretanto, em células que expressam ambas as formas de NOS (constitutiva e induzida) como astrócitos e células endoteliais, a maquinaria que regula a expressão da NOSi tendo o NO como modulador pode também regular a NOSn ou a NOSe. Em resumo, o aumento dos níveis de NO pela indução da NOSi leva à inibição do NF- κ B, diminuindo a expressão da NOSi e resultando em níveis mais baixos de NO. Essa queda nos níveis de NO estimula a expressão das formas constitutivas da NOS e, como consequência, os níveis de NO voltam a subir .

De forma interessante e ao contrário do que se poderia esperar, supressores da NOSi podem, na realidade, induzir um moderado aumento nas concentrações de NO por ativação enzimática direta de isoformas constitutivas de NOS, por um aumento na expressão de NO ou por ambos os fatores. Essa “personalidade dual” do NO é descrita por Colasanti & Suzuki, (2000).

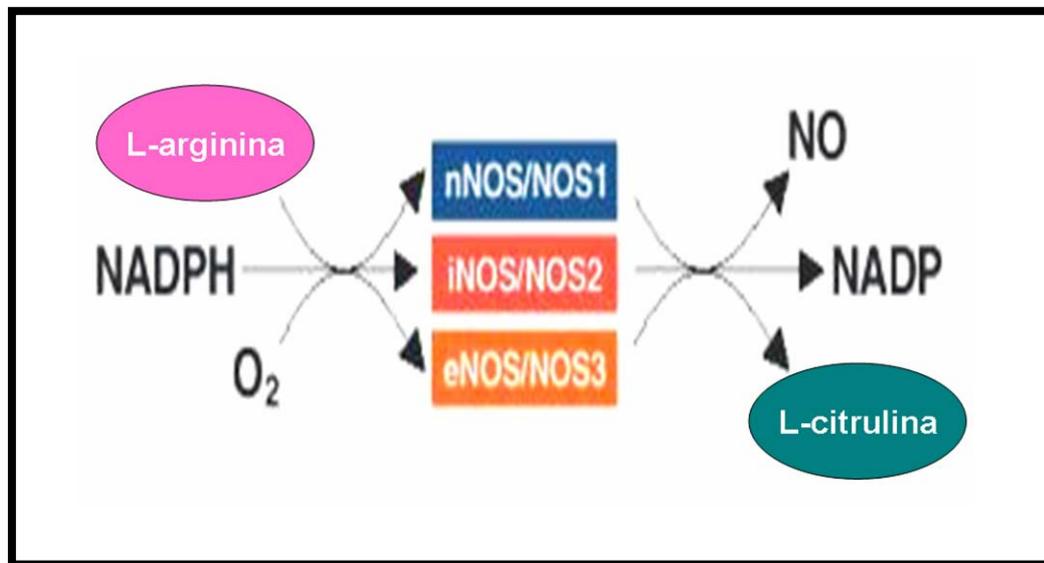


Figura 10. A enzima óxido nítrico sintetase catalisa a produção de NO e L-citrulina a partir de L-arginina, O₂ e elétrons derivados de NADPH. Fonte: www.rndsystems.com/images.

1.3.1.5. Apoptose e isquemia cerebral

A apoptose é uma forma de morte celular programada dependente de energia. Na última década, muito progresso foi feito no sentido de elucidar as várias vias de transdução de sinal que podem levar à morte celular. Baseado nesta informação, muitas cascatas apoptóticas têm sido descritas, como vias intrínsecas, extrínsecas, caspases-dependentes e

independentes, em associação com fases de início, comprometimento e execução. Tem se tornado aparente, portanto, que a apoptose não é uma série de vias claramente definidas, mas uma multiplicidade de vias interconectadas, altamente reguladas e convergentes resultando nas alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose, (Ashe & Berry, 2003). Evidencia-se, portanto, uma série de alterações morfológicas distintas: contração celular, condensação de cromatina, formação de protuberâncias citoplasmáticas na superfície celular, fragmentação da célula por separação das protuberâncias para formar múltiplos corpos apoptóticos pequenos que contêm organelas ou grupos de cromatina densa, (Wyllie et al., 1981).

As células apoptóticas são rapidamente removidas por fagocitose sem desencadear uma reação inflamatória. Em contraste a necrose celular geralmente afeta grande número de células contíguas, edema citoplasmático, mitocondrial e de outras organelas que levam à ruptura da membrana plasmática e lise celular e causam reação inflamatória. Fora do *core* necrótico de um infarto cerebral típico, há morte de neurônios em que a condensação da cromatina é freqüentemente um achado precoce proeminente e em modelos experimentais de isquemia, neurônios apoptóticos tendem a ser largamente ausentes na região central da isquemia, na qual a morte celular é necrótica. Portanto, neurônios apoptóticos são predominantemente encontrados na zona de penumbra isquêmica, (Love, 2003).

Existe evidência, especialmente em modelos animais indicando que alguma morte neuronal após isquemia é mediada pela ação de caspases (*cysteine-requiring aspartase-directed proteases*), as enzimas proteásicas

responsáveis pela morte celular programada, (Schulz et al., 1999) As caspases são sintetizadas como pro-enzimas inativas (pro-caspases).

Em episódios isquêmicos em humanos, os achados diferem consideravelmente se o infarto é devido a oclusão arterial aterotrombótica ou um período de parada cardíaca. Infarto aterotrombótico é o tipo mais comum de doença cérebro-vascular isquêmica. Morte neuronal neste tipo de infarto apresenta alguns dos achados bioquímicos precoces da morte celular programada como supra-regulação de pro-caspase-3 e rápido desaparecimento de algumas proteínas de reparo do DNA, (Love, 2000). Entretanto, maior evidência de morte neuronal mediada por caspases é observada em isquemia resultando de parada cardíaca, (Love, 2000).

1.3.1.6. Morte celular mediada por caspases

As caspases constituem uma família de proteases que incluem no seu sítio catalítico um pentapeptídeo contendo cisteína e apresentam a exigência de um resíduo aspartato na porção N-terminal do sítio de clivagem do substrato, (Love 2003).

A ativação resulta de clivagem proteolítica da pro-caspase geralmente devido a ação de outras caspases ativadas. As caspases podem ser divididas em 2 grandes grupos: aquelas da família convertendo interleucina-1 (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 14) que são envolvidas na maturação de citocinas e na indução de inflamação e aquelas caspases diretamente envolvidas na apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). Neste último grupo, pode-se dividir caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). Os

substratos degradados ou inativados por caspases incluem proteínas do citoesqueleto, proteínas do reparo do DNA , proteínas anti-apoptóticas como da família Bcl-2 e inibidores das DNAses caspase-ativadas, (Strasser et al., 2000).

Há duas principais vias de ativação de caspases: aquela mediada por receptor de morte e a via mitocondrial. A via mitocondrial de ativação de caspases é iniciada por muitas proteínas, sendo a da família Bcl-2 de papel central. A família Bcl-2 pode ser dividida em 3 grupos: grupo I-proteínas anti-apoptóticas e grupos II e III de proteínas pro-apoptóticas. Estímulos pro-apoptóticos tais como radiação ionizante, queda no pH citosólico, citocinas ou fatores de crescimento levam a modificação e translocação de Bcl-2 pro-apoptótica do citosol e de outras partes da célula para a membrana mitocondrial externa. Na membrana mitocondrial externa, multímeros dessas proteínas formam canais que permitem a liberação de citocromo-c do espaço intermembrana mitocondrial. A liberação do citocromo-c promove a oligomerização do fator ativador de apoptose-1 (Apaf-1), ligação da pro-caspase-9 ao Apaf-1, clivagem auto-catalítica e ativação da pro-caspase-9, e agregação de moléculas de citocromo c, pro-caspase-9 e Apaf-1 para formar o apoptossomo. O apoptossomo cliva e ativa a pro-caspase-3, dando origem a caspase-3, o efetor chave da morte celular caspase-mediada, (Love, 2003).

Modelos de isquemia experimental têm evidenciado supra-regulação e ativação da pro-caspase-3 precedendo a morte de neurônios em modelos de isquemia cerebral global e focal transitórias. Muito permanece, entretanto, a ser compreendido sobre a regulação transcripcional das proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, Apaf-1 e de outras proteínas necessárias

para a liberação do citocromo-c e formação do apoptossomo após isquemia cerebral. Evidências da ação do fator nuclear transcripcional NF-kB nessa seqüência de eventos é controversa, (Love, 2003).

A outra via de ativação de caspases, a via mediada por receptor, também contribui para o dano cerebral isquêmico. A liberação de TNF- α por neurônios, glia e células inflamatórias infiltrativas é uma explanação possível, (Sairanen, 2001).

1.4. Inflamação e isquemia cerebral

A trajetória da investigação sobre a inflamação é longa: alguns achados cardinais da inflamação foram descritos por Celsus no primeiro século DC. Já a perda da função associada com processo inflamatório foi relatado por Virchow. O biólogo russo Elie Metchnikoff demonstrou o processo de fagocitose na inflamação enquanto Thomas Lewis, com base em experimentos envolvendo respostas inflamatórias cutâneas, estabeleceu o conceito de que substâncias químicas, tais como histamina induzida localmente pela lesão, mediava alterações vasculares da inflamação. Este conceito fundamental inspirou as importantes descobertas de mediadores químicos da inflamação e o potencial estudo para o uso de agentes anti-inflamatórios.

A inflamação no sistema nervoso central é fator importante no processo fisiopatológico ocorrendo após o início da isquemia cerebral e a aterosclerose, processo patológico subjacente à maioria das doenças cerebrovasculares isquêmicas, é um processo inflamatório, (Emsley &

Tyrrell, 2002). De fato, as lesões da aterosclerose representam uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas que podem melhor ser descritas, em conjunto, como uma doença inflamatória. As diferentes formas de injúria vascular (os radicais livres causados pelo tabagismo, hipertensão, *diabetes mellitus*, agentes infecciosos tais como herpesvirus e *Chlamidia pneumoniae*, alterações genéticas e uma combinação desses fatores) aumentam a adesividade do endotélio a leucócitos e plaquetas, bem como sua permeabilidade. A lesão também induz o endotélio a ter propriedades pro-coagulantes ao invés de anticoagulantes e a formar moléculas vasoativas, citocinas e fatores de crescimento. A resposta inflamatória estimula a migração e proliferação de células musculares lisas na área da inflamação causando o espessamento da parede arterial, (Ross, 1999).

Evidências indicam que a resposta inflamatória induzida pela injúria isquêmica no cérebro tem início na microvasculatura, (Del Zoppo et al., 2000). Os microvasos cerebrais são estruturas ternárias consistindo de célula endotelial, lamina basal e prolongamentos de astrócitos (podócitos) ao redor, formando a barreira hemato-encefálica (BHE). Esse arranjo estrutural implica na transferência de nutrientes entre o lúmen microvascular e os neurônios, via processos astrogliais. A microvasculatura responde, portanto, a distúrbios do fluxo, exposição a radicais livres e geração de citocinas associados com isquemia-reperfusão, apresentando aumento da permeabilidade do componente celular endotelial da BHE, adesão de polimorfonucleares e plaquetas a receptores endoteliais e perda da conexão endotélio-astrócito que acompanha a perda da lâmina basal, alterando a integridade da BHE (Figura 11). A adesão das células endoteliais e astrócitos

à lâmina basal é mediada por receptores de integrinas que, com o início da isquemia, têm sua expressão diminuída, favorecendo o dano estrutural causado pela rápida perda dessa adesão, (Del Zoppo et al., 2000).

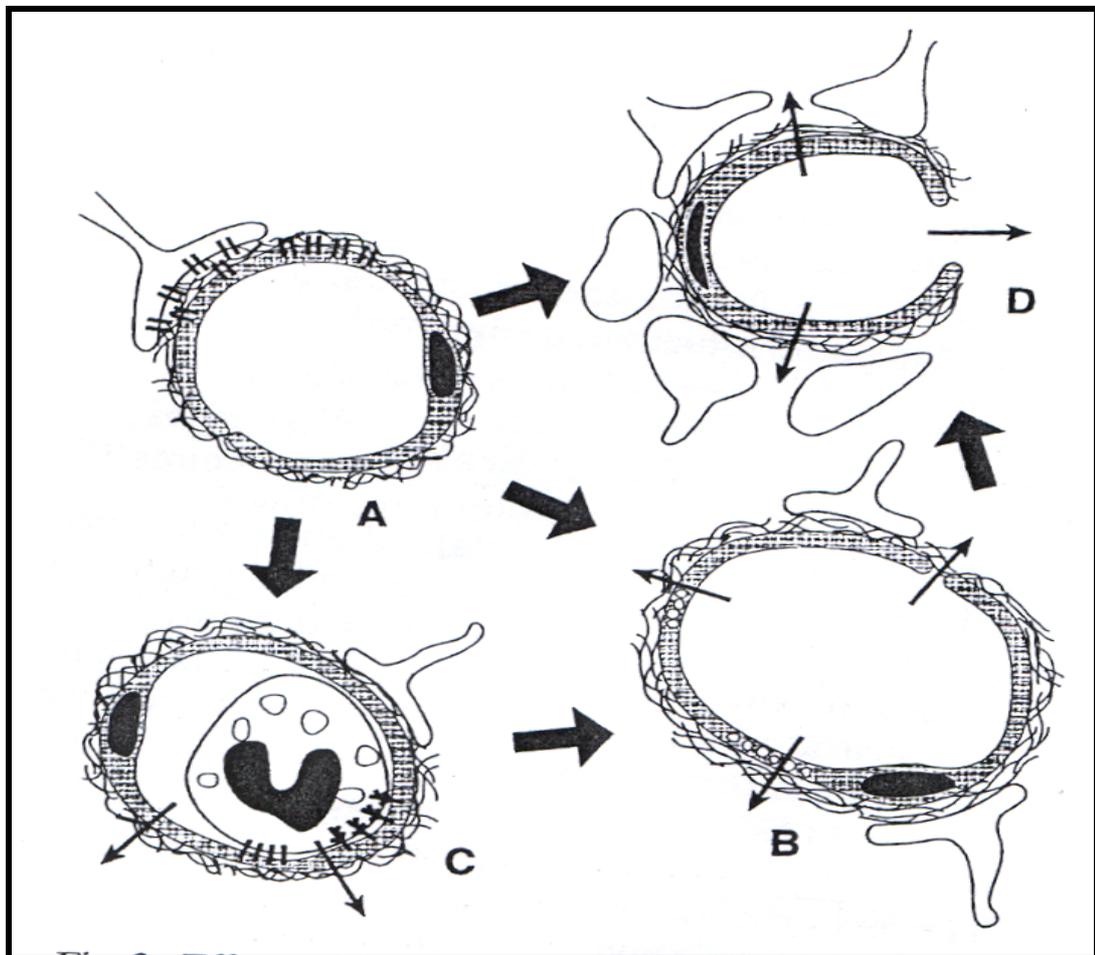


Figura 11. Efeitos da isquemia na integridade microvascular. (A) microvaso cerebral normal. Células endoteliais e astrócitos são aderidas à matrix por receptores de adesão. A barreira hemato-encefálica endotelial está intacta. Seguindo a isquemia focal, há um aumento da permeabilidade da célula endotelial (B); expressão de receptores de adesão de leucócitos e transmigração, que afeta a permeabilidade (C) e quebra da lâmina basal com perda do contato célula endotelial-astrócito e aumentada permeabilidade a células como, por exemplo, eritrócitos (D), (Del Zoppo & Hallenbeck, 2000).

A reação inflamatória como resposta do parênquima cerebral à lesão vascular é caracterizada pela infiltração de leucócitos, que na isquemia cerebral são principalmente neutrófilos e macrófagos/monócitos, (Akopov et al., 1996; Feuerstein et al., 1998), (Figuras 12 e 13). Há um número de mecanismos pelos quais os leucócitos podem produzir efeitos deletérios no parênquima isquêmico. Tem sido proposto que leucócitos obstruem os microvasos, (Iadecola, 1999; Campanella et al., 2002) e contribuem para o fenômeno de “*no-reflow*”, ou seja, a falta de recuperação completa do fluxo sanguíneo cerebral na área isquêmica após a reperfusão (Figura 14). Outros efeitos deletérios de leucócitos são devido a: alteração na reatividade vascular da artéria cerebral; liberação de enzimas citotóxicas, radicais livres de oxigênio, NO, e produtos da cascata fosfolipídica com produção de ácido araquidônico (AA) que, através da ação da cicloxigenase (COX), libera mediadores como prostaglandinas (PGs) e tromboxano A2 (TXA2) que contribuem para o edema pós-isquêmico. Para entrar na área isquêmica os leucócitos aderem às células endoteliais e migram para o parênquima cerebral. Durante cada uma dessas fases, suas funções são reguladas por moléculas relacionadas à inflamação (citocinas, quimocinas e moléculas de adesão celular) que são produzidas logo no início do processo isquêmico (Pantoni et al., 1998), (Figura 14).

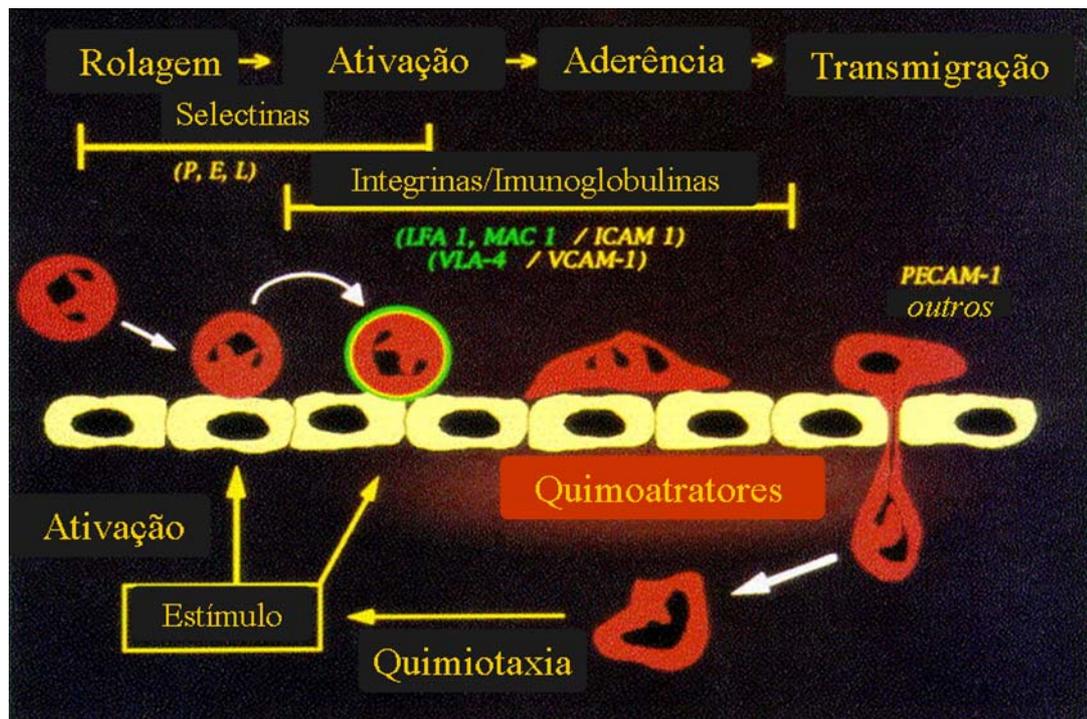


Figura 12. Seqüência de eventos leucocitários na inflamação, aqui representados por neutrófilos. Os leucócitos rolam, tornam-se ativados, aderem ao endotélio e transmigram através do endotélio, atravessam a membrana basal e migram em direção aos fatores quimiotáticos que emanam do sítio da lesão. Note o papel das selectinas no rolamento dos neutrófilos. As quimocinas ativam os leucócitos para aumentar a avidéz das integrinas (em verde). As moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) têm o papel de firmar a adesão e a transmigração, (Instel, 1999).

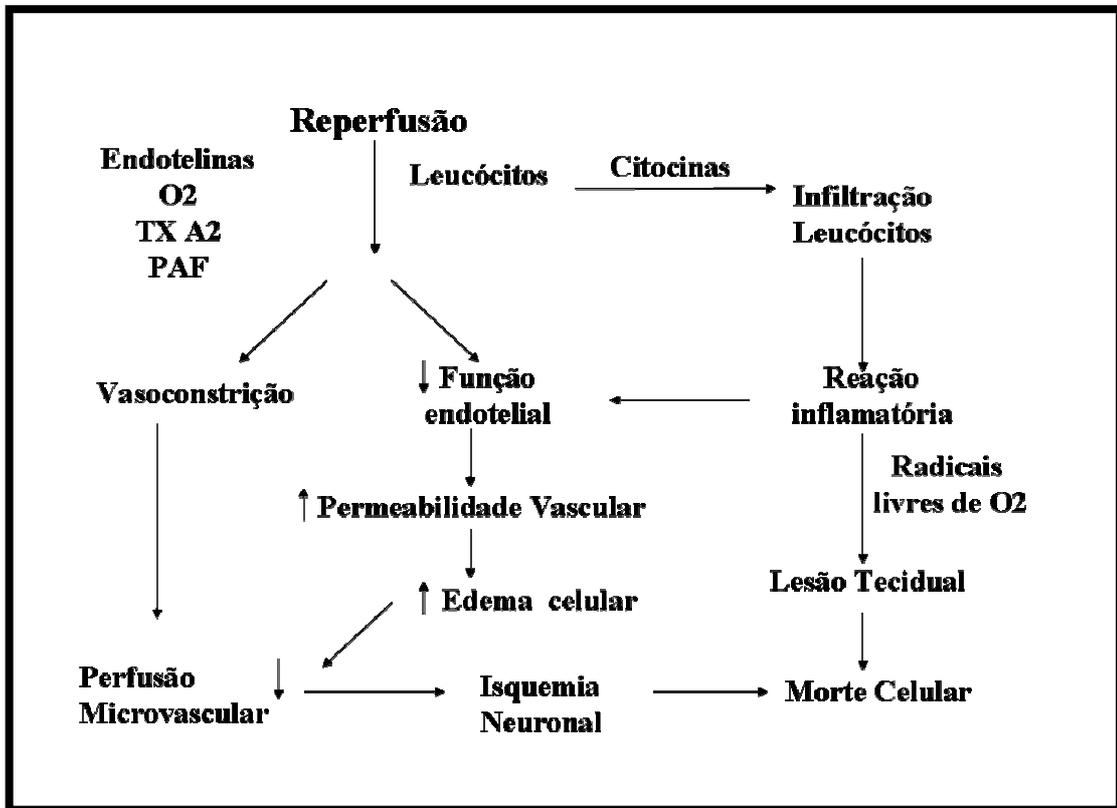


Figura 13. Fisiopatologia da lesão por reperusão cerebral, (Romsis, 2002).

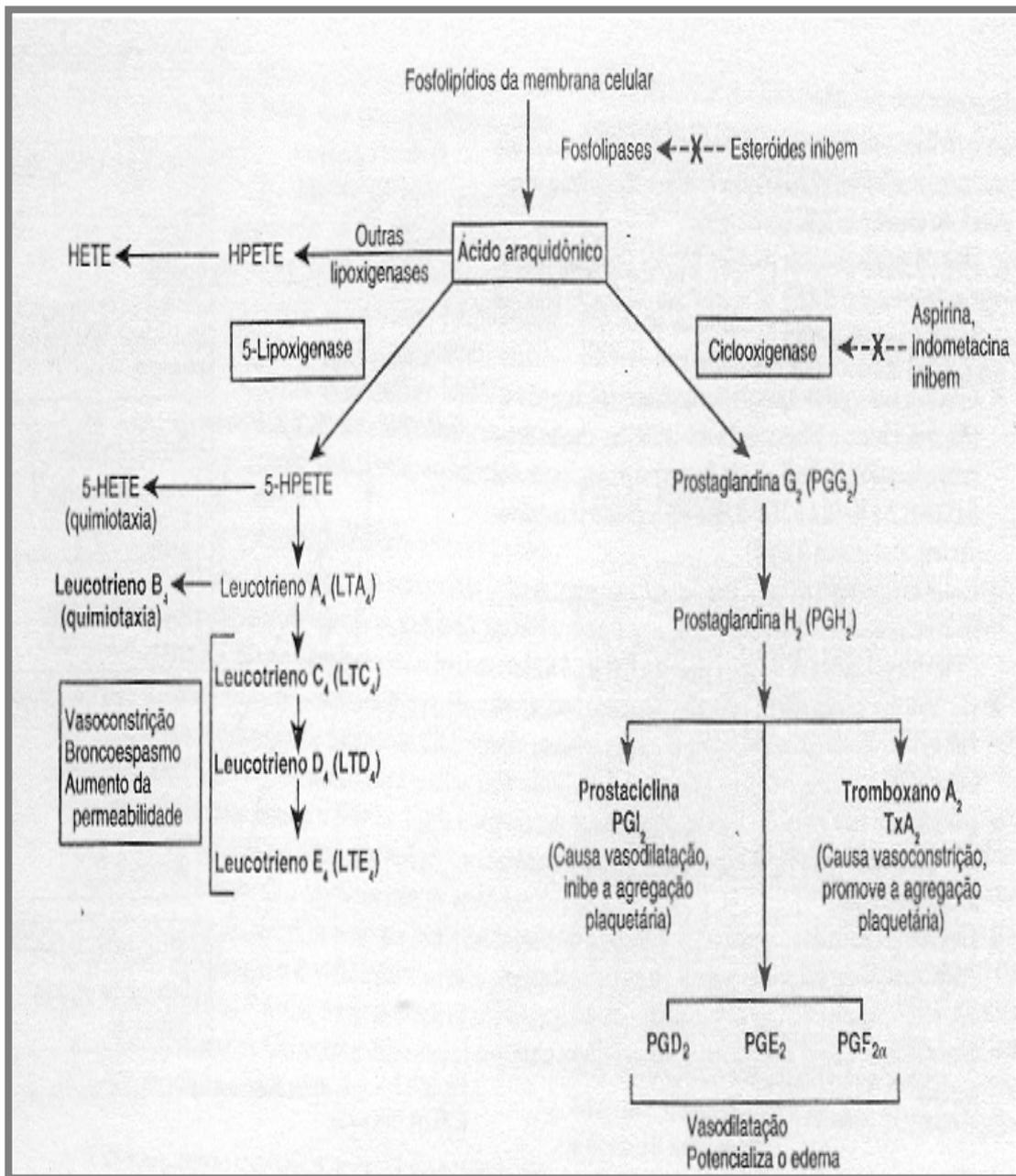


Figura 14. Geração de metabólitos de ácido araquidônico e sua participação na inflamação, (Instel, 1999).

1.5. Citocinas e isquemia cerebral

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que agem como mensageiros intercelulares e são produzidas por macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais, plaquetas, fibroblastos e muitos outros tipos celulares. Para produzir citocinas, as células têm que estar ativadas. As citocinas agem em receptores de células-alvo específicos e, após a ligação ao receptor, as citocinas ativam sistemas de segundos mensageiros intracelulares e, subsequente, proteínas quinases e fosfatases que causam regulação gênica através de fatores transcricionais. As citocinas são, portanto, os principais mediadores da resposta inflamatória e podem ter várias funções durante a isquemia cerebral: atração de leucócitos; estímulo para síntese de moléculas de adesão em leucócitos, células endoteliais e outras; facilitam a trombogênese por aumentar os níveis de fator ativador de plaquetas (PAF), (Pantoni et al., 1998). Entre as principais representantes, podemos citar:

1.5.1. *IL-1 (Interleucina-1)*

A IL-1 existe sob duas formas separadas (α e β). Achados evidenciam aumento da expressão de IL-1 durante isquemia cerebral. Os possíveis mecanismos prejudiciais induzidos ou ativados pela IL-1 na isquemia cerebral incluem aumento da lesão mediada por NMDA, proliferação de micróglia, liberação de AA e síntese de NO estimulada, (Liu et al., 1993; Yamasaki et al., 1995).

1.5.2. TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α)

A síntese aumentada de TNF- α tem sido demonstrada aumentada no processo isquêmico cerebral, (Liu et al., 1994). Os efeitos são mediados através da ligação a receptores específicos, seguida da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases), fosfolipase A2 e fosfolipase C, (Kolesnick & Golde, 1994). O segundo passo na via de transdução de sinal do TNF- α , como para outras citocinas, é intranuclear com a ativação de muitos fatores transcripcionais como o NF- κ B que induz genes para moléculas de adesão e outras citocinas, favorecendo a aderência de neutrófilos e acúmulo nos microvasos.

1.5.3. IL-6 (Interleucina-6)

Não tem sido completamente elucidado se a IL-6 exerce efeitos anti-inflamatórios, pro-inflamatórios ou ambos. Seu efeito anti-inflamatório depende da inibição da produção de IL-1 e TNF- α via um mecanismo de feedback negativo e estímulo para produção de antagonistas de receptor de IL-1 e TNF- α . Por outro lado, também tem sido apresentado que a IL-6 induz a expressão do gene da fosfolipase A2 e, como consequência, a produção de leucotrienos (LTs), PGs e PAF que estão envolvidos no dano isquêmico cerebral, (Crowl et al., 1991).

1.5.4. TGF- β (Fator transformador- β de crescimento)

O TGF- β (Fator transformador- β de crescimento) é uma citocina que regula e estimula a proliferação celular e tem papel central nos mecanismos de reparo tecidual. A mais alta expressão de RNAm de TGF- β

foi detectada na zona do processo isquêmico de penumbra. Algumas evidências sugerem um possível papel protetor do TGF- β na isquemia cerebral por reduzir a aderência de neutrófilos a células endoteliais, suprimir a liberação de produtos derivados de nitrogênio e oxigênio de macrófagos, (Gross et al., 1993), promover a angiogênese na área de penumbra e reduzir a expressão de outras citocinas tais como TNF- α , inibindo seu mecanismo de transdução, (Lieberman et al., 1989).

1.5.5. IFN- γ (Interferon- γ)

O IFN- γ é uma proteína produzida por células T ativadas. Não é produzido nas células do sistema nervoso central, e sua liberação neste nível é possível somente quando uma quebra da barreira hemato-encefálica permite a infiltração de linfócitos no parênquima cerebral. IFN- γ induz a expressão de uma variedade de citocinas, (Rose et al., 1997). Um outro possível papel do IFN- γ na isquemia cerebral é a produção de NO através da indução da expressão do RNAm para a enzima NOS, (Kamijo et al., 1994).

1.6. Moléculas de adesão celular na isquemia cerebral

A adesão de leucócitos na superfície endotelial e sua subsequente migração dos microvasos para o parênquima cerebral é mediada por uma variedade de moléculas na superfície tanto dos leucócitos como das células endoteliais, (Figura 11). As moléculas de adesão são divididas em 4 principais famílias, cada uma das quais tendo uma função diferente: integrinas (adesão célula-matriz), superfamília de imunoglobulinas (adesão célula-célula), caderinas e selectinas. Sob condições normais há pouca ou

nenhuma expressão de moléculas de adesão na superfície celular. Sua expressão é induzida por processo inflamatório como na isquemia cerebral, onde a expressão aumentada é mediada por citocinas. Entre as mais estudadas moléculas de adesão estão a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), da superfamília de imunoglobulinas, e as integrinas. A possível relevância dessas moléculas de adesão na patogênese do dano isquêmico cerebral é demonstrado pelo fato que anticorpos anti-ICAM-1 inibiram o processo inflamatório e a injúria associada à reperfusão em um modelo animal de oclusão transitória da artéria cerebral média, com diminuição significativa no volume do infarto e no acúmulo de neutrófilos, (Kanemoto et al., 2002). O uso de um anticorpo anti- α 4 integrina também evidenciou redução significativa da extensão do infarto cerebral em um modelo de isquemia experimental em ratos provavelmente devido a uma inibição da função leucocitária, (Relton et al., 2001).

1.6.1. Limitações e perspectivas

O primeiro estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado em pacientes com doença cerebrovascular isquêmica (DCVI) aguda usando um anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 foi realizado (*Enlimomab Acute Stroke Trial*), (Sherman, 2001) e limitações para o seu uso foram evidenciadas: efeitos adversos como progressão da DCV, edema cerebral, transformação hemorrágica do infarto e ocorrência de casos de meningite asséptica devido ao efeito imunogênico desta droga. A terapia com anti-ICAM-1 pode ser efetiva somente após a reperfusão devido ao envolvimento de leucócitos nessa fase, mas não com oclusões vasculares permanentes. É possível, contudo, que a terapia com anti-ICAM-1 seja

benéfica somente em combinação com trombólise, (Sherman, 2001). Outra limitação é o tempo e a via de administração. Nos estudos experimentais, os anticorpos anti-ICAM-1 não foram administrados além de uma hora após a reperfusão enquanto no estudo clínico, a droga foi usada nas primeiras seis horas do início dos sintomas. A administração sistêmica poderia também levar a uma redução nas defesas do hospedeiro e uma maior predisposição a infecções, mostrando que o papel imunogênico dos anticorpos anti-ICAM-1 deve ser cuidadosamente analisado, (Pantoni et al., 1998).

Essas considerações sugerem que uma abordagem multiterapêutica deve ser o futuro para o tratamento das DCVIs. (Lindsberg et al., 2000; Ginsberg, 2003).

1.7. Quimiocinas na isquemia cerebral

As quimiocinas (citocinas quimioatrativas) são moléculas de baixo peso molecular divididas em duas principais famílias: C-X-C e C-C quimiocinas. As quimocinas C-X-C tendem a atrair neutrófilos enquanto as quimiocinas C-C agem preferencialmente em monócitos/macrófagos. A produção e secreção das quimiocinas são estimuladas pelas citocinas IL-1 α e β e TNF- α que têm pouca capacidade de atrair leucócitos polimorfonucleares e monócitos, necessitando, portanto, da ação desses fatores quimiotáticos. A citocina indutora de quimioatração de neutrófilos (CINC) foi estudada no dano cerebral isquêmico transitório em ratos com elevado aumento dos seus níveis após a reperfusão. E, através do uso de um anticorpo anti-CINC, foi demonstrada uma supressão significativa na atividade de mieloperoxidase (marcador de infiltração de neutrófilos) e no edema cerebral do tecido

cerebral pós-isquêmico, (Yamasaki et al., 1997). Através de injeção intracerebroventricular de um antagonista para receptor de quimiocina C-C (ação nos monócitos/macrófagos) usado em camundongos submetidos à oclusão de artéria cerebral média, foi observado um efeito protetor na injúria cerebral isquêmica, com diminuição do número de macrófagos ativados na área de penumbra isquêmica e diminuição do volume de infarto, (Takami et al., 2002).

1.8. Marcadores clínicos de inflamação de parede vascular

Como o processo inflamatório tem um papel chave na patogênese da aterogênese e da isquemia cerebral, evidências sugerem que níveis plasmáticos elevados de ICAM-1, P-selectina, IL-6, TNF- α e de proteína C reativa (CRP) poderiam ser utilizados como marcadores inflamatórios que poderiam predispor indivíduos com risco aumentado para ruptura de placa ateromatosa e conseqüente isquemia associada, ou seja, indicadores de risco para doenças cardíaco e cerebrovasculares. Poderia indicar, portanto, um grupo de indivíduos nos quais as terapias de prevenção primária tais como perda de peso, cessação do tabagismo e prática de exercícios deveriam ser ainda mais enfatizadas, (Blake & Ridker, 2001).

1.9. Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA) através da ação da cicloxigenase (COX) na isquemia cerebral

O AA é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico) que é derivado diretamente da dieta ou pela conversão do ácido graxo essencial ácido linoléico. Não ocorre livre na célula mas é normalmente esterificado em fosfolipídios de membrana. É liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação de fosfatases celulares como a fosfolipase A₂ que é ativada pela ação do Ca²⁺ e de outros mediadores na cascata isquêmica. Os metabólitos do AA, também chamados eicosanóides, sofrem a ação de duas maiores classes de enzimas: as cicloxigenases (COX) liberando prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) e as lipoxigenases (LX) liberando leucotrienos (LTs) e lipoxinas. (Figura 14) Os metabólitos dessas reações influenciam cada passo do processo inflamatório. Agentes que suprimem a atividade da COX (as drogas anti-inflamatórias não-esteroidais) inibem, portanto, a inflamação. (Figura 14) A via da cicloxigenase é mediada por duas diferentes enzimas: a COX -1 e a COX-2. A COX-1 é expressa em muitas células e tem papel na agregação plaquetária, secreção gástrica e função renal. A enzima COX-2 foi descoberta em 1991 e seus primeiros inibidores foram descritos em 1992. É expressa em neurônios excitatórios e sua expressão é regulada por muitos estímulos tais como mediadores inflamatórios e mitógenos. As PGs e TXs liberados por essas enzimas estão envolvidos na inflamação e os principais representantes são a PGE₂, PGD₂, PGF_α, PGI₂ (prostaciclina) e o TXA₂. A PGI₂ é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária e também potencia efeitos quimiotáticos de outros mediadores. O TXA₂ é um potente agregador plaquetário e vasoconstritor. Estudo com antagonista de TXA₂ demonstrou que este composto causa redução na produção de radicais

livres e atenua a infiltração neutrofílica após isquemia cerebral transitória experimental, (Matsuo et al., 1996). O equilíbrio tromboxano-prostaciclina tem sido implicado como um evento precoce na formação de trombo em vasos sanguíneos coronarianos e cerebrais. As lipoxigenases liberam os leucotrienos (LTs) e o LTB₄ é um potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos, agindo na agregação e adesão de leucócitos e na geração de radicais livres e liberação de enzimas lisossomais. Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam intensa vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. As lipoxinas são geradas pela interação das plaquetas com neutrófilos e têm ações tanto anti como pro-inflamatórias. (Figura 14)

O PAF é um outro mediador derivado de fosfolipídeos pela ação da fosfolipase A₂ (Figura 14). Causa agregação plaquetária e é conhecido por apresentar múltiplos efeitos inflamatórios, causando aumento da adesão de leucócitos ao endotélio, quimiotaxia e descarga oxidativa, desencadeando muitos dos achados da inflamação. Estudo com antagonista de PAF demonstrou redução na produção de radicais livres e atenuou a infiltração neutrofílica após isquemia cerebral transitória experimental, (Matsuo et al., 1996). Uma variedade de tipos celulares podem produzir PAF como plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células endoteliais.

1.9.1. Produtos da cicloxigenase e do óxido nítrico na inflamação pós-isquêmica

Evidências sugerem que produtos da cicloxigenase e de NO têm importante papel na lesão isquêmica cerebral. Como já citado, NO e a enzima NOSi contribuem para o dano isquêmico cerebral e a expressão da NOSi ocorre no cenário de marcada reação inflamatória, nos vasos sanguíneos cerebrais e nas células inflamatórias infiltrando o cérebro isquêmico, (Ginsberg et al., 1997) (Figura 12) Um outro gene de interesse que é expresso durante a inflamação é o da cicloxigenase-2 (COX-2).

1.9.2. COX-2 na isquemia cerebral

Após o processo de isquemia cerebral, COX-2 encontra-se super-regulada, com pico em 12 a 24 horas após a isquemia, (Del Zoppo et al., 2000). Esta enzima está também localizada em neurônios e células vasculares localizadas nas bordas do território isquêmico (zona de penumbra). Dados indicam que a inibição da COX-2 reduz o volume do infarto em um modelo de isquemia focal experimental, (Nogawa et al., 1997) e reduz o dano neuronal em modelo de isquemia global, (Nakayama et al., 1998). Essas observações aumentam a possibilidade de que produtos da reação de COX-2 contribuem para a evolução do dano isquêmico. Inibidores da COX-2 podem também ter efeitos protetores através da ação na transcrição gênica, (Khayyam et al., 1999). Existe uma proximidade temporal e espacial na expressão de NOSi e COX-2 seguindo um episódio de isquemia cerebral, sugerindo que NO produzido pela ação da NOSi ativa a COX-2 e aumenta o potencial tóxico desta enzima, mostrando que inibição

da NOSi reduz os produtos de reação da COX-2 no cérebro pós-isquêmico, (Nogawa et al., 1998).

1.10. Tenoxicam

1.10.1. Descrição da droga

O tenoxicam (TXC), com nome comercial Tilatil[®], é um derivado tienotiazínico da classe oxicam, uma classe de ácidos enólicos, designado quimicamente como 4 – hidroxí – 2 – metil – N – 2 – piridinil - 2H – tieno [2,3-e] - 1,2 – tiazino – 3 – carboxamida - 1,1 - dióxido e caracterizado como um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), (Figura 18).

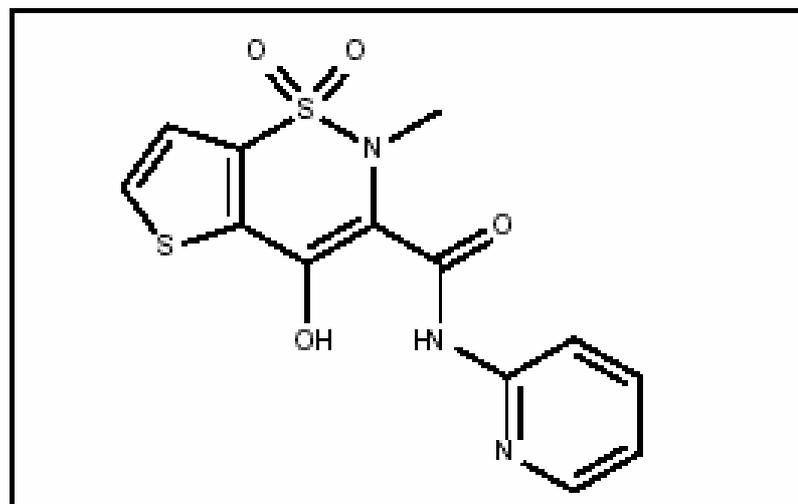


Figura 15. Estrutura química do Tenoxicam

1.10.2. Mecanismo de ação

Como a maioria dos AINEs, o TXC é um inibidor competitivo, reversível e não seletivo da atividade das duas isoformas da COX (COX1/COX2), mas parecendo ter discreta preferência pela enzima COX2 já que apresenta menores efeitos gástricos e renais em relação aos outros AINES da classe dos oxicans, (Clive et al., 1984; Brooks et al., 1991; Meade et al., 1993; Yamada et al., 1997). O TXC inibe, portanto, a via cicloxigenase do metabolismo do AA impedindo a formação de PGs e TXs e conseqüentemente bloqueando o processo inflamatório decorrente da ação desses mediadores, mas não inibe a formação de eicosanóides tais como leucotrienos, (Figura 12).

1.10.3. Efeitos gerais do TXC

Todos os AINEs apresentam efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios, mas há importantes diferenças em suas atividades. Quando empregados como analgésicos, geralmente são efetivos apenas contra dor de leve a moderada intensidade, mas apesar de seus efeitos máximos serem menores que dos opióides, por exemplo, eles não apresentam os efeitos opióides no sistema nervoso central como risco de depressão respiratória e o desenvolvimento de dependência física. Entretanto, os AINEs encontram sua principal aplicação clínica como agentes anti-inflamatórios, no tratamento de desordens músculo-esqueléticas tais como artrite reumatóide, osteoartrites, espondilite anquilosante, promovendo somente alívio sintomático da dor e inflamação associadas a essas condições, não interferindo na progressão das lesões patológicas ao tecido. Outra importante

indicação é no tratamento da dor pós-operatória que é particularmente bem controlada pelos AINEs, (Instel, 1999).

1.10.4. Farmacocinética

O TXC é completamente biodisponível após a administração oral mas tem somente 80% de bioviabilidade após administração retal. É cerca de 99% ligado a proteínas plasmáticas e tem um baixo volume de distribuição. A meia-vida média de eliminação é de cerca de 70 horas. A metabolização é hepática para a biotransformação em metabólitos inativos 5-hidroxi e 6-O-glicuronato que são excretados por via renal e biliar. Picos de concentração adquiridos no líquido sinovial são menores que 1/3 daquela do plasma. A dose padrão anti-inflamatória é de 20 mg em dose única diária e o ajuste da dose parece desnecessário em idosos ou naqueles com prejuízo de função renal ou hepática. A duração da ação, como de todos os AINEs que são inibidores reversíveis da COX, é primariamente relacionada ao clearance farmacocinético da droga no corpo, (Instel, 1999).

1.10.5. Indicações e usos

O TXT é utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas do sistema músculo-esquelético: artrite reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante, artroses e em afecções extra-articulares como tendinites, bursites, peri-artrite dos ombros (síndrome ombro-mão) ou dos quadris, distensões ligamentares, entorses e gota aguda. Estudos evidenciam, ainda, a eficácia do uso de TXC no tratamento da dor pós-

operatória (Merry et al., 1998; Eggers et al., 1999; O'Hanlon et al., 2000; Huang et al., 2002).

1.10.6. Contra-indicações

O TXC não deve ser administrado em pacientes com reconhecida hipersensibilidade a droga; em pacientes nos quais salicilatos ou outros AINEs tenham induzido sintomas de asma, rinite ou urticária; em pacientes que sofram ou sofreram de doenças graves do trato gastrointestinal superior como úlcera duodenal e gástrica.

1.10.7. Interações com outras drogas

Como ocorre com outros AINEs, o salicilato desloca o TXC dos sítios de ligação às proteínas, aumentando assim a eliminação e o volume de distribuição do TXC. O tratamento concomitante com salicilato ou outros AINEs deve ser evitado devido ao risco aumentado de reações adversas gastrointestinais. A administração concomitante com o metotrexato (MTX) tem sido associada a uma redução na secreção tubular renal do MTX e conseqüente aumento de sua concentração plasmática com toxicidade severa desta droga. Portanto, recomenda-se cautela no uso desta associação. O TXC pode diminuir o clearance renal do lítio ocasionando um aumento de suas taxas plasmáticas e toxicidade. Existe uma interação do TXC com diuréticos poupadores de potássio que pode levar a hipercalcemia e insuficiência renal. Como ocorre com outros AINEs, o TXC pode reduzir o efeito anti-hipertensivo de bloqueadores α -adrenérgicos e de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). Não foram observadas interações

cl clinicamente relevantes do uso de TXC com bloqueadores de canais de cálcio, atenolol, agentes α -adrenérgicos de ação central, digitálicos, cimetidina, varfarin ou hipoglicemiantes orais como glibenclamida e tolbutamida.

1.10.8. Efeitos teratogênicos

Embora não tenham sido observados efeitos teratogênicos nos estudos com animais, não existem dados sobre a segurança do TXC durante a gravidez. Como os AINEs têm um efeito inibidor sobre a síntese das PGs, quando administrados nos últimos meses da gestação pode ocasionar a obliteração do canal arterial no feto.

1.10.9. Efeitos colaterais da terapia com TXC

O mais comum é uma propensão para induzir ulceração gástrica ou intestinal que pode, algumas vezes, ser acompanhada de anemia decorrente de sangramento ativo. A tendência em causar erosões e ulcerações variam consideravelmente e esse efeito se correlaciona com a inibição da biossíntese de PGs gástricas, especialmente PGI₂ e PGE₂ que servem como agentes citoprotetores na mucosa gástrica. Esses eicosanóides inibem a secreção ácida no estômago, aumentam o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e promovem a secreção de muco citoprotetor no intestino. Outro efeito que depende do bloqueio da síntese de PGs endógenas inclui distúrbios na função plaquetária pela ação do TXC inibindo a formação de TXA₂, potente agente agregante plaquetário. Na função renal, tem pouco efeito em indivíduos normais, presumivelmente porque a produção de PGs

vasodilatadoras tem um papel menor na regulação do fluxo sanguíneo renal (FSR) e na taxa de filtração glomerular (TFG). Contudo, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática com ascite, insuficiência renal crônica e naqueles pacientes hipovolêmicos, o FSR e a TFG podem ser diminuídos (Clive, 1984) Em adição a efeitos hemodinâmicos no rim, retenção de sal e água pode decorrer da diminuição da inibição PG-induzida da reabsorção de Cl e da ação do hormônio anti-diurético. Isso pode causar edema em alguns pacientes. Certos indivíduos demonstram intolerância ao uso de TXC, manifestada por sintomas que variam de rinite vasomotora, edema angioneurótico, urticária, asma brônquica e edema laríngeo, broncoconstrição, hipotensão e choque (anafilaxia). O mecanismo subjacente a essa reação de hipersensibilidade não é completamente conhecido. Tem sido levantada a hipótese de que a reação reflète desvio de metabólitos de AA em direção à formação de leucotrienos e outros produtos da via da lipoxigenase que não é inibida pelo TXC. Essa hipótese, contudo, não explica porque somente uma minoria de pacientes demonstram essas reações.

No SNC, são relatadas reações como cefaléia e vertigem em maior frequência e fadiga, distúrbios do sono e perda do apetite em menor frequência e distúrbios visuais em casos isolados. Como os outros AINEs, o TXC pode levar a reações adversas como leucopenia, agranulocitose e trombocitopenia.

1.11. Relevância e justificativa

Em virtude da elevada morbi-mortalidade ocasionada pelas doenças vasculares cerebrais isquêmicas e pela vasta literatura científica evidenciando o papel da inflamação na progressão do dano isquêmico após o processo de isquemia-reperfusão, optamos por usar um modelo de isquemia cerebral global transitória e investigar a possível interferência citoprotetora do tenoxicam, um anti-inflamatório não-esteroidal usado atualmente no tratamento de afecções reumatológicas, osteo-articulares e pós-cirúrgicas, neste modelo. Como a base principal para a ação terapêutica do tenoxicam consiste na inibição da atividade enzimática da cicloxigenase, é então esperado que, pela ação de suas propriedades anti-inflamatórias, o dano cerebral induzido pela inflamação na reperfusão pós-isquêmica seja minimizado. Utilizamos a região do hipocampo por ser esta uma estrutura mais vulnerável à hipóxia e à isquemia cerebral. Foram analisados perfis bioquímicos, moleculares e estruturais neste modelo proposto.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A DVCI é objeto constante de estudos clínicos e experimentais que tentam esclarecer os mecanismos associados à fisiopatogenia do processo isquêmico cerebral. Considerando a aterosclerose como uma doença inflamatória e envolvida na patogênese da lesão vascular isquêmica, considerando a inflamação contribuindo para o dano neuronal na reperfusão pós-isquêmica e considerando que a DVCI acomete principalmente a população acima de 65 anos, resolvemos estudar a contribuição da ação anti-inflamatória do tenoxicam na reversão de danos causados pela isquemia-reperfusão em ratos machos idosos que foram submetidos à ligadura de carótidas bilaterais seguida de reperfusão por uma ou 24 horas. Foram analisados, através de estudos ex-vivo, os seguintes parâmetros em hipocampos de ratos distribuídos em grupos controle, falso-operados tratados com tenoxicam 10 mg/kg, isquemiados e isquemiados tratados com tenoxicam 2,5 e 10 mg/kg:

- Atividade enzimática da mieloperoxidase;
- Níveis de monoaminas e de seus metabólitos;
- Níveis de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato);
- Níveis de nitrito;
- Níveis de lactato, piruvato e ATP;
- Análise histopatológica das áreas cerebrais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados aproximadamente 200 ratos Wistar, machos, com idade acima de 01 ano, pesando 250 – 450g, provenientes do Biotério Central da UFC, mantidos à temperatura de 25° C, com ciclo de 12h claro/escuro e com livre acesso à água e alimento. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas de ética em pesquisa experimental.

3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com xilazina a 2 % (10 mg/kg) e quetamina (90mg/kg) administrados por via intraperitoneal. Foi realizada incisão cervical mediana e expostas as artérias carótidas comuns que foram isoladas e clampeadas com clips aneurismáticos por 45 minutos, (Figura. 16). Após esse período, os clips foram removidos e a sutura da incisão com fio mononylon 3.0 foi procedida. O grupo falso-operado foi submetido a procedimento semelhante com exceção do clampeamento das artérias carótidas.



Figura 16. Cirurgia com incisão cervical mediana mostrando o clampeamento das artérias carótidas comuns.

3.3. Drogas usadas nos experimentos

- Tenoxicam (Tilatil-Roche, Brasil) – 40mg/2 ml frasco-ampola
- Xilazina 2% (Virbaxyl-Virbac, Brasil) - ampola
- Quetamina (Francotar-Virbac, Brasil) – 100mg/ml ampola

O Tenoxicam foi diluído em salina. Os reagentes usados no preparo dos tampões e demais soluções eram de grau analítico.

3.4. Protocolo experimental

GRUPO	TRATAMENTO
1	Falso-operado
2	Isquemia 45 min
3	Isquemia 45 min + Tenoxicam 2,5mg/kg i.p.*
4	Isquemia 45 min + Tenoxicam 10mg/kg i.p.*
5	Falso-operado + Tenoxicam 10mg/kg i.p.*

i.p. – intra-peritoneal

* - O tratamento com tenoxicam-dose única foi realizado imediatamente após o término do procedimento cirúrgico.

Ao final do tratamento, todos os animais retornaram às gaiolas por um período de 01 hora ou de 24 horas para então serem submetidos à decapitação para retirada do cérebro e dissecação dos hipocampus para as análises subseqüentes.

3.5. Estudo histopatológico

Os cérebros usados para a análise histopatológica foram fixados com formol neutro a 10% durante 03 dias. Após um corte coronal inicial (1mm) ao nível do quiasma óptico foram obtidos cortes seqüenciais nas direções antero-posterior e estes foram processados em parafina. Cortes histológicos de 8-10µm foram então corados pela Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio binocular Nikon e fotografadas.

A análise histopatológica (semi-quantitativa) foi feita por um caminho “simples cego” e as estruturas foram analisadas segundo o Atlas de Paxinos & Watson, 1986. O grau de dano cerebral foi baseado na presença de vacuolização, encarquilhamento neuronal e desarranjo da neurópila. A gravidade da lesão foi definida através do uso de uma escala percentual de 0 (ausência de lesão) a 3 (lesão severa), dentro de cada estrutura examinada por microscopia ótica (100x). Os resultados foram expressos como: zero- não existiu dano estrutural; 1- leves alterações detectáveis; 2- moderadas alterações da estrutura afetada; 3- intensas alterações. Foram analisadas em média três lâminas por cada animal.

3.6. Método de coloração pela hematoxilina-eosina

3.6.1. Corte

Parafina, 8µm

3.6.2. Soluções

Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina 7g
- Álcool absoluto 50ml
- Alumen de potássio 100g
- Água destilada 1000ml
- Óxido amarelo de mercúrio 2,5g
- Solução de Eosina à 10%

3.6.3. Método

As lâminas foram desparafinizadas com xilol por 10 min, desidratadas em álcool absoluto (3 banhos) e lavadas em água corrente. Em seguida, foram cobertas com solução de hematoxilina por 10 min, lavadas com água corrente e deixadas na água por 10 minutos. As lâminas foram então cobertas com solução de Eosina (rapidamente) e lavadas com água corrente. Depois foram desidratadas com 3 imersões em álcool absoluto, em seguida imersas em xilol (3 banhos) e montadas em Bálsamo do Canadá.

3.7. Determinação da atividade da mieloperoxidase em hipocampos

3.7.1. Princípio

A mieloperoxidase é uma enzima presente nos grânulos primários de neutrófilos e utilizada, portanto, como um marcador de infiltração neutrofílica. A extração da mieloperoxidase destes grânulos depende de procedimentos para rompê-los que se obtêm através do uso de brometo de hexadeciltrimetilamonio a 0,5% de acordo com a técnica de Bradley et al., 1982. A atividade da enzima é medida através de espectrofotometria em comprimento de onda de 460nm. Uma unidade de atividade de mieloperoxidase é definida como aquela degradando um micromol de peróxido por minuto a 25°C.

3.7.2. Protocolo experimental

Os animais foram decapitados 24 horas após o procedimento cirúrgico para a retirada dos cérebros que foram dissecados sobre gelo e os hipocampos foram retirados e mergulhados em nitrogênio líquido e homogenizados. O homogenato obtido foi colocado em tubos de ensaio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 e brometo de hexadeciltrimetilamonio a 0,5%. O material foi submetido a 3 ciclos de sonicação em água gelada por 10 segundos (aparelho) seguida de congelação 05 min/descongelação. As amostras foram colocadas em tubos *Eppendorf* e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 14.000 rpm por 15min e o sobrenadante foi retirado para análise. A medida da atividade de mieloperoxidase foi processada em espectrofotômetro Beckman, como descrito a seguir: 0,1 ml de cada amostra a ser medida foi colocado em tubos de ensaio em triplicata e adicionadas à 2,9 ml de solução tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,0 contendo 0,167 mg/ml de diidrocloreto de o-dianisidine e peróxido de hidrogênio a 0,0005%. A variação na absorbância a 460 nm no tempo zero e após 5 min foi então registrada e como resultado final, foram calculadas a média das triplicatas e a diferença das absorbâncias no tempo zero e 5 minutos.

3.7.3. Soluções reagentes

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0
- Brometo de Hexadeciltrimetilamonio a 0,5%
- Dihidrocloreto de o-dianisidine 167mg/ml
- Peróxido de hidrogênio a 0,0005%

3.8. Dosagem de nitrito

A dosagem de nitrito foi realizada segundo o método de Green e colaboradores em 1982.

3.8.1. Princípio

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0.1% em água, sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5%) revela a presença de nitrito em uma amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo apresentando absorvância máxima em 560 nm.

3.8.2. Reagentes utilizados:

Need 0.1% (N-1-naftiletilenodiamina)

Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%

Reagente de uso (Reagente de Griess): misturar partes iguais de Need 0.1%, H₂O bidestilada, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico a 5%

3.8.3. Curva padrão

Solução de NaNO₂ estoque (10 mM em tampão). Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 1,32; 0,75 μM).

3.8.4. Protocolo

Para a realização do ensaio foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL do sobrenadante (centrifugado) do homogenato a 10% dos hipocampos dos ratos em salina ou 100 μL dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL de salina. A leitura da absorbância foi feita em 560 nm em leitor de placa. As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x) e então determinada a equação da reta que foi utilizada para a determinação da concentração de cada amostra.

3.9. Determinação de monoaminas (DA, NE, 5-HT) E metabólitos (DOPAC, HVA, 5-HIAA) com HPLC

3.9.1. Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) (Figura 17). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). A mistura a ser separada é introduzida na coluna e carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se houver diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente quando os solutos são iônicos e detectam a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos quando estes têm a característica de se oxidarem ou se reduzirem com relativa facilidade.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos. Neste estudo, foi utilizado este tipo de detector que reage com uma quantidade muito menor de soluto (em torno de 1%). Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próxima à superfície do eletrodo e amplificação e medida da corrente produzida.

3.9.2. Protocolo Experimental

Os animais foram decapitados 24 horas após o término do período isquêmico de 45 minutos e os cérebros foram dissecados sobre gelo. Os hipocampus foram retirados e utilizados separadamente para o preparo de homogenatos a 10%. Os tecidos foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) por 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos Eppendorf para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 r.p.m. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi então injetada no equipamento de HPLC (Figura 17), para análise eletroquímica das concentrações de monoaminas e seus metabólitos.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6mm e diâmetro da partícula de 03 µm, da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0 contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. Dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT), ácido

hidroxiindolacético (5-HIAA) e noradrenalina (NE) foram eletroquimicamente detectados usando-se um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.



Figura 17. Aparelho de HPLC com detecção eletroquímica. Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC

3.9.3. Soluções Reagentes

3.9.3.1. Fase Móvel

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e o volume completado para 400 ml com água puríssima (Milli-Q). Esta

solução foi ajustada para um pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foram adicionados 75mg de SOS (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 ml com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação com gás hélio, e posteriormente foram adicionados 20 ml de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 ml de tetrahydrofurano (Sigma, MO, EUA) de modo a completar um volume final de 500 ml.

3.9.3.2. Ácido Perclórico 0,1 M

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 ml de água Milli-Q.

3.9.4. Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng (20 µl) de NE, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA), (Figura 18). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados foram expressos em ng/g tecido, (Figura 18).

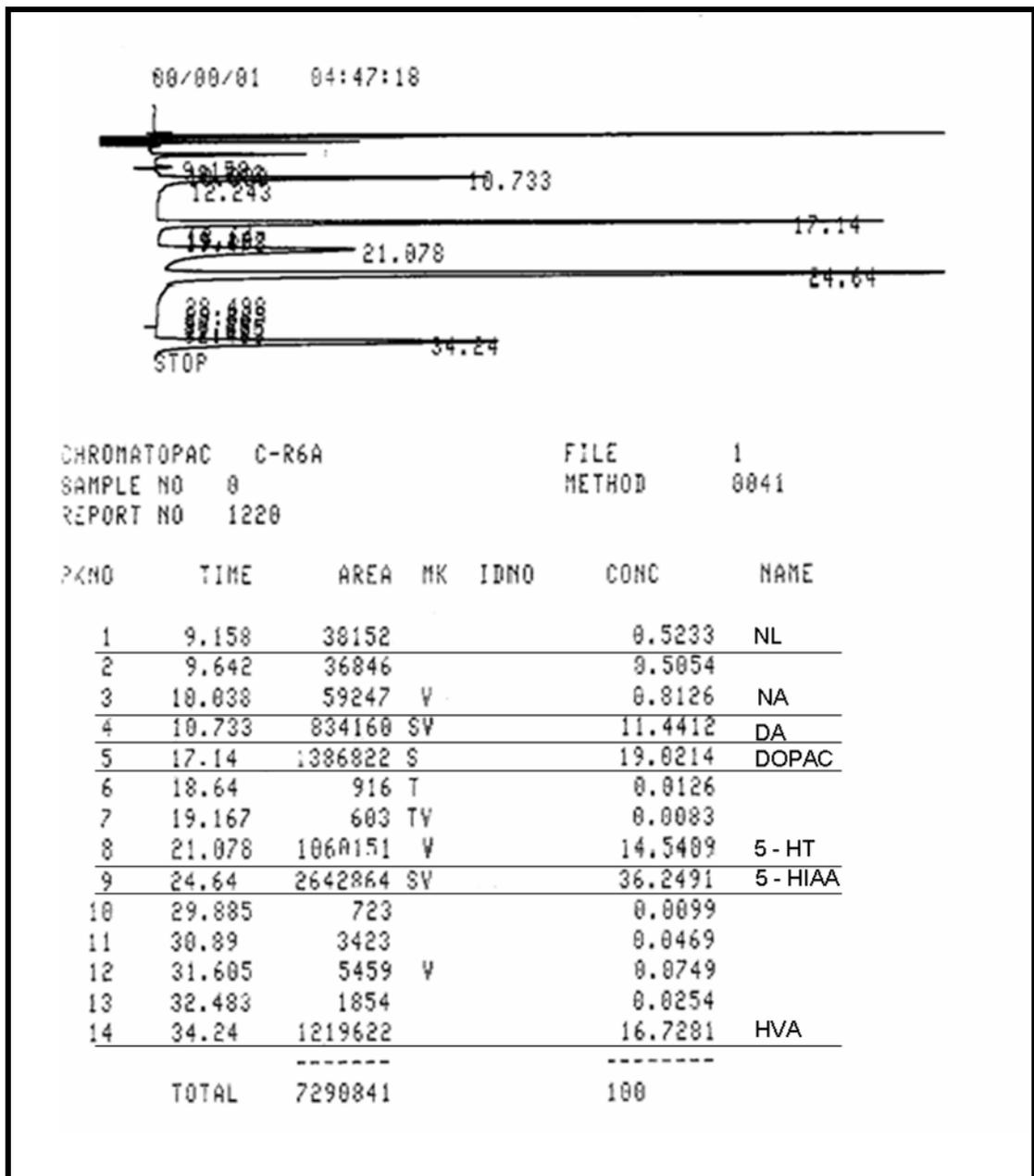


Figura 18. Modelo de cromatograma padrão das monoaminas (DA, NE, 5-HT) e metabólitos (DOPAC, HVA, 5-HIAA), obtido através do aparelho de HPLC com detecção eletroquímica do Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia –UFC.

3.10. Determinação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) em HPLC

3.10.1. Método

Para a determinação dos níveis de aminoácidos, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com detector de fluorescência (Figura 19). A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como método de detecção específica e é um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem. Fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não fluorescentes por reações de derivatização realizadas pré ou pós-coluna.

3.10.2. Protocolo Experimental

Os animais foram decapitados 24 horas após a cirurgia e os cérebros foram dissecados sobre gelo. Os hipocampus foram retirados e foram utilizados separadamente para o preparo de homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) por 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos *Eppendorf* para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana (Millipore-0,2 µm) e posteriormente associado a uma solução de derivatização pré-coluna para obtenção de fluorescência, em uma proporção de 1:1. Um minuto depois do início dessa associação, uma alíquota de 20 µl foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para a análise de glutamato e aspartato.

Para a análise dos aminoácidos, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 15 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu, Japão, foi utilizada. A fase móvel foi utilizada em gradiente utilizando duas fases: A NaH_2PO_4 (50mM) e metanol (20% v/v) em pH 5,5; B- Metanol puro (100%). Aspartato (ASP) e glutamato (GLU) foram detectados através de um detector de fluorescência (Modelo RF-535 da Shimadzu, Japão) com comprimento de ondas de *EX-Wavelength* (370 nm) e *EM-Wavelength* (450 nm). Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu. A quantidade dos aminoácidos foi calculada por comparação da altura dos picos obtidos com a média dos padrões e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ tecido.

3.10.3. Soluções Reagentes

3.10.3.1. Fase Móvel

Foram pesados 1,724 g de NaH_2PO_4 (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 195 ml com água puríssima (Milli-Q) com pH ajustado para 5,5. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente foram adicionados 50 ml de metanol (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) para um volume final de 250 ml.

3.10.3.2. Ácido Perclórico 0,1 M

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 ml com água Milli-Q.

3.10.4. Padrões

Os padrões foram preparados e realizada uma curva de concentração com três diferentes concentrações (0,025; 0,0125 e 0,00625 μmol) de ASP e GLU (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou da área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido, (Figura 19).

3.10.5. Solução de derivatização

A preparação da solução de derivatização foi dividida em duas fases:

3.10.5.1. Preparação do tampão Borato

Foram pesados 1,24 g de BORAX-Sodium tetraborato (Sigma-EUA) em um Becker e adicionados 45 ml de água puríssima (Milli-Q) e ajustada para pH 9,3 com hidróxido de sódio e completado para um volume final de 50 ml com água Milli-Q.

3.10.5.2. Preparação da reação de derivatização (OPA-40 mmol/L)

Foram pesados 27 mg de O-Phthaldialdehyde-OPA (Sigma-EUA) em um Becker e adicionados 500 μl de etanol 99% (Vetec-Brasil), 20 μl de 2-mercaptoetanol (Merck, EUA) e 4,5 ml do tampão borato (preparado previamente). Esta solução de derivatização foi deixada por 24 horas em

repouso em uma temperatura em torno de 20 C. Após esse período, a solução foi utilizada no máximo por duas semanas, e após a primeira semana foram adicionados 05 µl de 2-mercaptoetanol.



Figura 19. Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência. Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC

3.11. Determinação dos metabólitos, ATP, lactato e piruvato, através de análise enzimática

3.11.1. Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, os animais foram decapitados 24 horas após a cirurgia e no segundo grupo, a dissecação foi realizada uma hora após o término da cirurgia. Os cérebros

foram dissecados sobre gelo e os hipocampos foram retirados e mergulhados em nitrogênio líquido e macerados. O tecido em pó obtido foi colocado em tubos de ensaio pré-pesados com 05 ml de ácido perclórico (HClO₄) 0,75 M e foram novamente pesados. Um indicador universal de pH (Sigma) foi adicionado juntamente com uma solução de hidróxido de potássio a 20 % para ajustar o pH entre 7,0 e 8,0. Os tubos foram repesados e então centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e colocado em novos tubos de ensaio que foram novamente pesados e utilizados para análise.

3.11.2. Princípio Básico de Análise Enzimática

Nas condições do presente protocolo um ensaio enzimático foi baseado no princípio de que uma reação enzimática específica em que há participação do substrato é completada com a redução de NAD⁺/NADP ou oxidação de NADH/NADPH. Os nucleotídeos piridina (NAD⁺, NADP) absorvem luz a 260nm e, no estado reduzido (NADH, NADPH) têm uma absorção adicional com o máximo de 340 nm. Portanto, através da medida da densidade óptica a 340 nm, a conversão enzimática do substrato pode ser acompanhada diretamente em uma cubeta no espectrofotômetro (Beckman).

Sabendo-se que, em uma reação enzimática específica um micromol de substrato reage com um micromol de NAD⁺/NADP (ou de NADH/NADPH), a mudança na densidade óptica refletirá rigorosamente a quantidade de substrato consumida pela reação. Sendo as condições do ensaio ótimas, a conversão do substrato é praticamente completa e a diferença da

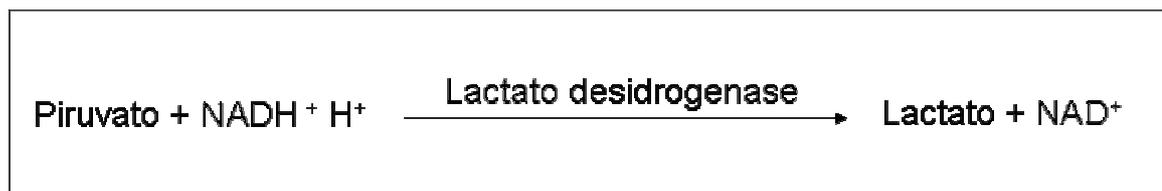
densidade óptica pode ser usada para calcular a concentração do substrato no tecido cerebral, multiplicando-se por um fator de diluição apropriado.

Foram então procedidas as determinações dos metabólitos piruvato, lactato e ATP, em hipocampos de ratos, nos diversos grupos experientais.

3.11.3. Determinação de piruvato

Os níveis de piruvato foram medidos de acordo com método descrito por Hohorst *et al* (1959).

3.11.3.1. Seqüência da reação



O equilíbrio da reação em pH 7.0 é suficientemente desviado para a direita, garantindo uma medida quantitativa dos níveis de piruvato desde que a concentração de NADH não seja menor que 0,01 mM.

3.11.3.2. Solução tampão para o ensaio

10 ml de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,9

01 ml de NAD⁺ 0,5%

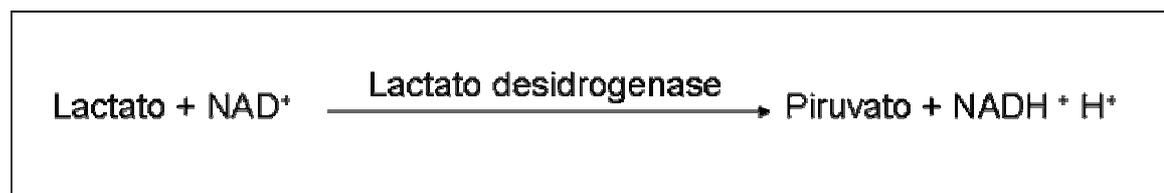
O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 1 ml da amostra neutralizada e 1 ml de solução tampão. A cubeta para controle

continha 1 ml de água destilada e 1 ml da solução tampão do ensaio. As cubetas foram lidas em aparelho espectrofotômetro (Beckman) a 340 nm, antes e 10 minutos após a adição de 0,01 ml de lactato desidrogenase.

3.11.4. Determinação de lactato

As concentrações de lactato foram determinadas de acordo com o método descrito por Hohorst et al (1963).

3.11.4.1. Seqüência da reação



O equilíbrio desta reação ocorre no lado do lactato e NAD^+ . No entanto, para garantir a completa conversão do lactato, os produtos da reação devem ser removidos. Prótons são aprisionados por uma reação alcalina; o piruvato reage com hidrato de hidrazina na solução tampão para formar piruvato hidrazona e, em adição, um grande excesso de NAD^+ e enzima são usados para se obter rapidamente um ponto final da reação. A lactato desidrogenase reage somente com l-(+)-lactato e isto oferece especificidade para o ensaio.

3.11.4.2. Solução tampão para o ensaio:

40 ml de Tris 0,2 M

5 ml de Hidrato de hidrazina 100%

25 mg de EDTA

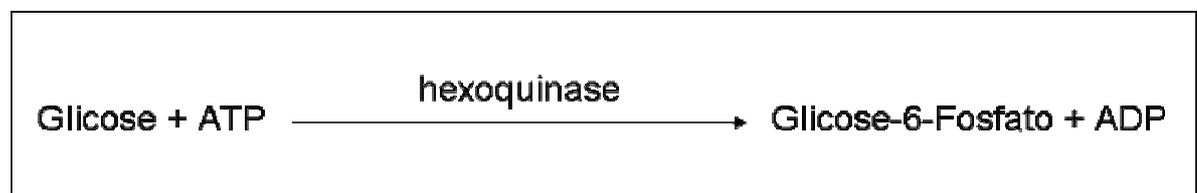
Água destilada para completar 100 ml de solução.

O pH da solução tampão foi ajustado para 9,5 com ácido hidrolórico 05 M, e a solução pode ser estocada por até duas semanas a 4°C. No início do ensaio, 01 ml de NAD⁺ 1% foi adicionado a cada 10 ml de solução tampão. O volume total em cada cubeta foi de 02 ml, consistindo de 0,2 ml da amostra neutralizada, 0,8 ml de água e 01 ml de solução tampão contendo NAD⁺ 1%. A cubeta para controle continha 01 ml de água destilada e 01 ml da solução tampão do ensaio. Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes e 35 e 45 minutos após a adição de 0,02 ml da enzima lactato desidrogenase.

3.11.5. Determinação de ATP

As concentrações de ATP foram determinadas de acordo com o método descrito por Hohorst et al (1963). A hexoquinase cataliza a fosforilação da glicose com ATP, na presença do Mg²⁺, produzindo a glicose-6-fosfato.

3.11.5.1. Seqüência da reação



Na presença de concentrações equivalentes de glicose e Mg^{2+} , o ATP é convertido quantitativamente pela hexoquinase em ADP e glicose-6-fosfato.

3.11.5.2. Solução tampão para o ensaio

10 ml de Tris 0,1 M pH 7,4

1 mg/ml NADP (para cada 10 ml do tampão, adicionar 01 ml de NADP a 1%)

2 ml de $MgCl_2$ 0,1 M

0,5 ml de glicose PA. 100%.

O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 0,5 ml da amostra neutralizada, 0,5 ml de água e 1 ml de solução tampão contendo NADP a 1%. A cubeta para controle continha 1 ml de água destilada e 1 ml da solução tampão do ensaio. Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes e 10 e 15 minutos após a adição de 0,01 ml da enzima hexoquinase.

3.11.6. Cálculos dos metabólitos no tecido cerebral

Todos os cálculos dos metabólitos são baseados nas alterações de densidade óptica medidas a 340 nm nas amostras das cubetas, seguidas após adição da enzima e subtraídas das mudanças inespecíficas que podem ocorrer nas cubetas de controle. Portanto:

<p style="text-align: center;">Diferença de densidade óptica (DDO) = (Alteração da absorbância da amostra na cubeta) – (Alteração da absorbância na cubeta controle)</p>

Desde que o coeficiente molar de extinção de NADH é 6,22 cm²/μmol, a quantidade de substrato na cubeta é igual a (DDO/6,22) x volume total na cubeta. Este resultado é então multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato.

Peso do tecido + HClO₄/peso do tecido X (peso extrato neutro/peso extrato ácido)

X (volume total na cubeta /volume extrato neutro na cubeta)

X (DDO/6,22) = μmol do metabólito/ g de tecido.

3.12. Análise estatística

No caso da análise histológica foram feitos testes de Kruskal-Wallis e Dunn e ANOVA e teste de Dunnett ou Turkey para os testes paramétricos. O programa de computador usado foi o Graph Pad 3[®] (para PC). Na determinação da mieloperoxidase foram utilizados análise de variância (ANOVA) e teste de Turkey e nos demais experimentos os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett, com o critério de significância de p<0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise histológica em estriato de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória e os efeitos do tratamento com tenoxicam (10 mg/kg, i.p.)

A figura 20 mostra as lesões decorrentes da exposição à isquemia cerebral transitória em estriato de ratos idosos. Podemos observar a presença de vacuolização citoplasmática e encarquilhamento neuronal como achados principais da lesão isquêmica. Essas alterações não foram observadas no grupo controle. Houve uma tendência para reversão dessas alterações com o uso do tenoxicam na dose de 10 mg/kg, evidenciando-se apenas vacuolização e encarquilhamento neuronal discretos. Numa escala de escores que varia de 0 a 3, onde zero demonstra ausência de lesão, 1 demonstra lesão mínima, 2 demonstra lesão moderada e 3 demonstra lesão severa, o grupo controle (n = 4) obteve escore 0, o grupo isquemiado (n = 3) obteve escore 3 e o grupo tratado com tenoxicam 10 mg/kg (n = 3) obteve escore 1. Houve diferença significativa entre o grupo isquemiado quando comparado com o controle ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações), (ver Tabela 1).

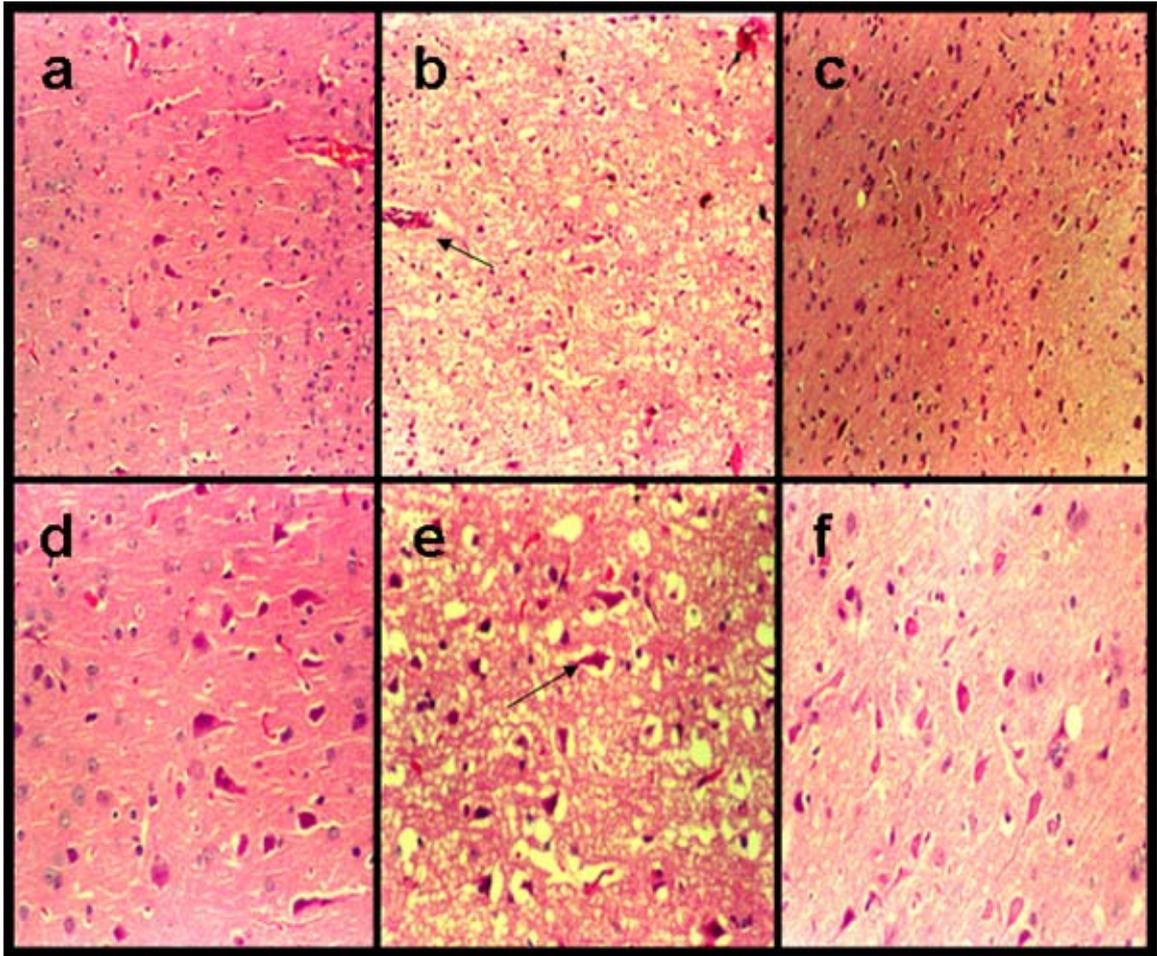


Figura 20. Alterações histológicas em corpo estriado de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória. a - grupo controle, sem alterações; b - isquemia; c - isquemia + TXC 10 mg/kg (aumento 4x), d - controle; e - isquemia; f - isquemia + TXC 10 mg/kg (aumento 40 x)

Tabela 1. Alterações histopatológicas em estriato de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória na ausência e presença do tenoxicam (10 mg/kg, i.p.)

Grupos	Lesão (escore)
Controle	0 ± 0
Isquemia	3 ± 0 *
Isquemia + TXC 10 mg/kg	1 ± 0

O tenoxicam (10 mg/kg, i.p.) foi administrado imediatamente após o término do período isquêmico. Os animais foram sacrificados após 24 horas de reperfusão. Os dados são expressos como média ± EPM. O número de animais por grupo foi de 3 a 4. * $p < 0.05$, quando comparado com grupo controle (Kruskal-Wallis e teste de Dunn de múltiplas comparações).

4.2. Efeitos do tenoxicam no acúmulo de neutrófilos (aumento na atividade da mpo no hipocampo) causado pela oclusão carótidea bilateral seguida de reperfusão

Como ilustrado na figura 21, o grupo submetido à isquemia e reperfusão exibiu um significativo aumento na atividade da MPO hipocampal quando comparado com os animais do grupo controle (controle (n-10) $0,0313 \pm 0,0052$, isquemia (n-8) $0,1879 \pm 0,0292$ U/ g de tecido, $p < 0.001$, ANOVA e teste de Tukey). Este aumento indica o acúmulo de neutrófilos no hipocampo dos animais sujeitos à 45 min de isquemia seguida de 24 horas de reperfusão.

O grupo controle tratado com tenoxicam na dose de 10 mg/kg não apresentou resultados diferentes daqueles do grupo controle (controle (n-10) $0,0313 \pm 0,0052$, controle + TXC 10 mg/kg (n-5) $0,0041 \pm 0,009$), mas no grupo submetido à isquemia-reperfusão, o tenoxicam em ambas as doses de 2,5 e 10 mg/kg significativamente atenuou o aumento na atividade da MPO (isquemia (n-8) $0,1879 \pm 0,0292$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $0,0074 \pm 0,0009$, isquemia + TXC 10 mg/kg $0,0041 \pm 0,0003$ U/g de tecido, $p < 0.001$, ANOVA e teste de Tukey).

4.3. Efeito do tenoxicam nos níveis de nitrito/nitrato em homogenato de hipocampo de ratos idosos com isquemia-reperfusão

Observamos um aumento expressivo e significativo nos níveis de nitrito/nitrato nos animais submetidos à isquemia cerebral por 45 min seguida de 24 horas de reperfusão em relação ao grupo controle (controle (n=5) $0,26 \pm 0,53$; isquemia (n=5) $5,55 \pm 1,45 \mu\text{M}$, $p < 0.05$, ANOVA e teste de Dunnett). O uso do tenoxicam nas doses de 2,5 e 10 mg/kg não mostrou reversão dos valores de nitrito/nitrato decorrentes da isquemia (isquemia (n=5) $5,55 \pm 1,45$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n=3) $4,102 \pm 0,739$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n=4) $4,010 \pm 0,953 \mu\text{M}$), (Figura 22).

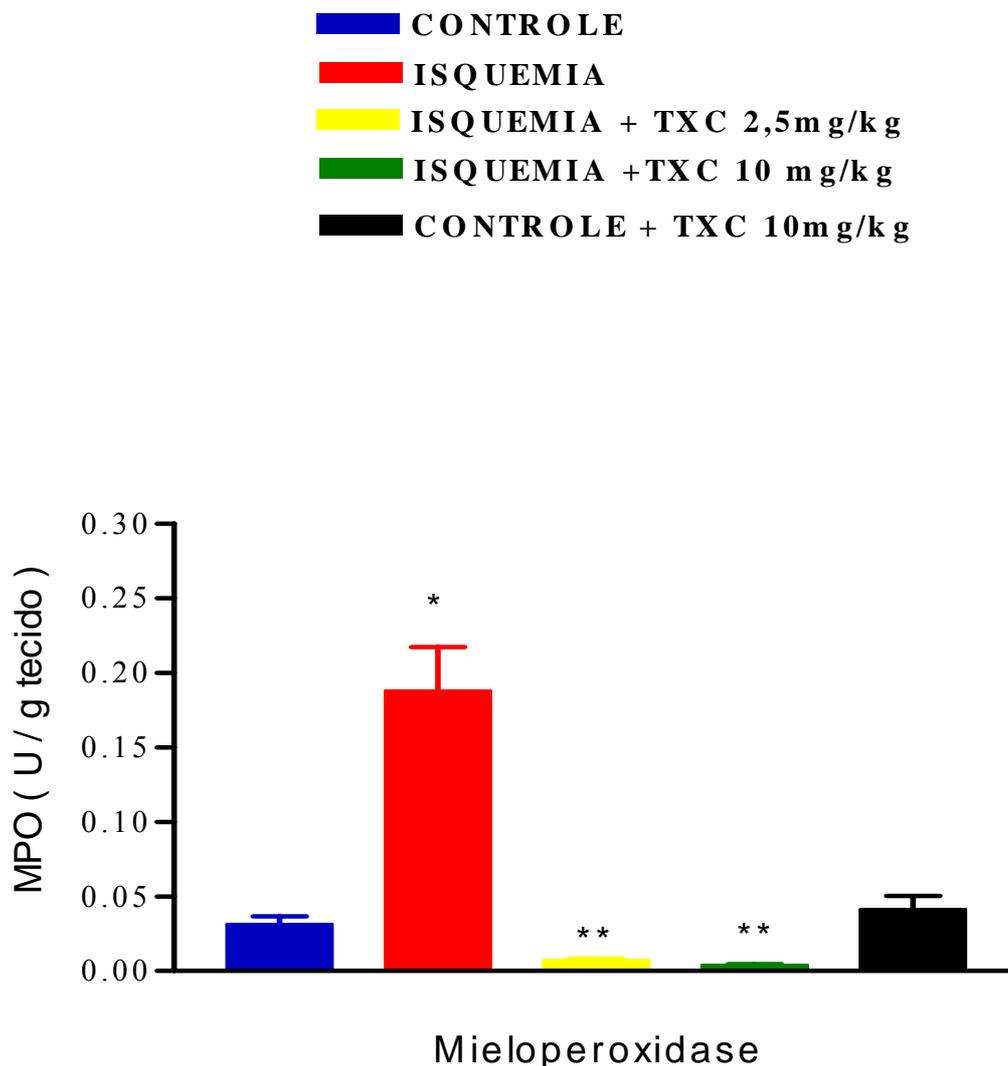


Figura 21. Efeito do tenoxicam na atividade da MPO em hipocampo de ratos idosos após a oclusão bilateral de carótidas e reperfusão. O tenoxicam foi administrado após 24 horas de reperfusão e os hipocampus foram dissecados para análise. Os resultados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo variou de 10 a 4 * vs controle, ** vs isquemia, $p < 0,001$, ANOVA e teste de Tukey de múltiplas comparações.

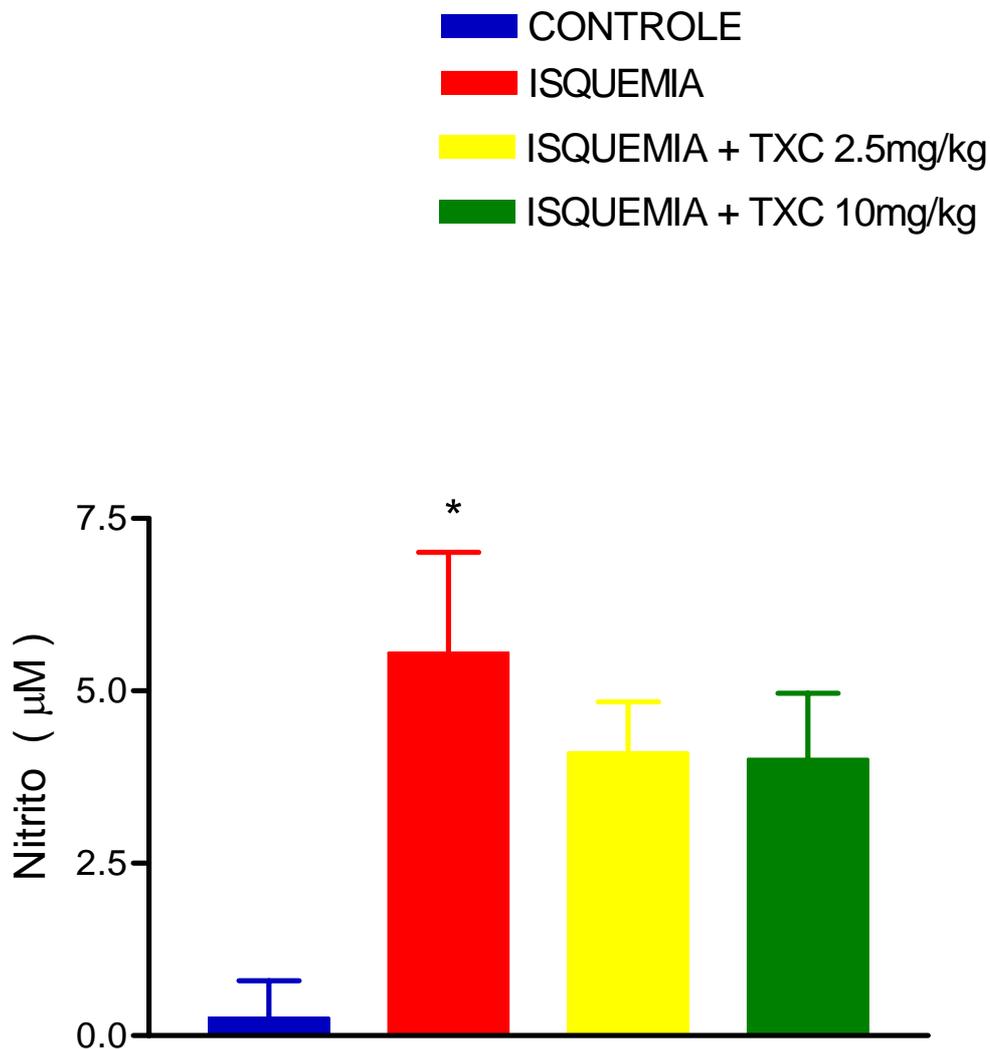


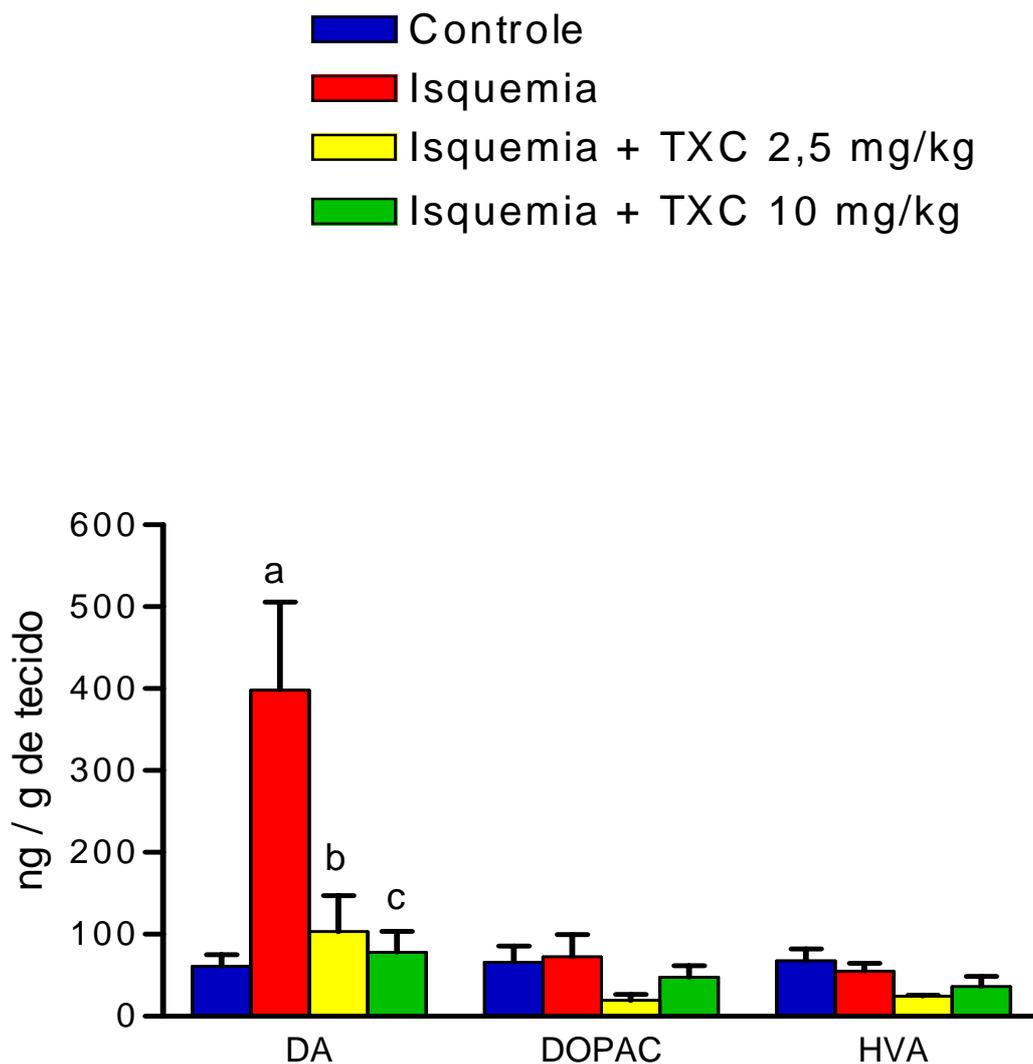
Figura 22. Efeitos do tenoxicam sobre a produção de nitrito em homogenato de hipocampo de ratos idosos isquemiados. Os resultados são expressos como média \pm EPM. O tenoxicam foi administrado por via intraperitoneal, imediatamente após 45 min de isquemia cerebral (vs controle) e a dissecação dos hipocampos foi realizada após 24 horas de reperfusão. * $p < 0.05$, ANOVA e teste de Dunnett.

4.4. Efeito do tenoxicam em ratos idosos com isquemia-reperfusão, na determinação dos níveis hipocampais de monoaminas

Na figura 23, evidenciamos os níveis de DA e metabólitos (DOPAC e HVA) em hipocampo de ratos idosos sujeitos à isquemia cerebral e sacrificados após 24 horas de reperfusão. Houve um aumento significativo de DA no grupo de animais isquemiados em relação ao grupo falso-operado (controle (n-4) $61,0 \pm 14,4$, isquemia (n-5) $398,1 \pm 107,8$ ng/g de tecido, $p < 0.01$, ANOVA e Dunnett). O tratamento com tenoxicam tanto na dose de 2,5 como na dose de 10 mg/kg reverteu de modo significativo o aumento dos níveis de DA no grupo com isquemia-reperfusão (isquemia (n-5) $398,1 \pm 107,8$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-4) $103,3 \pm 43,9$, $p < 0.05$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-7) $78,0 \pm 25,7$ ng/g de tecido, $p < 0.01$, ANOVA e Dunnett).

Os níveis de DOPAC permaneceram sem alterações significativas após a isquemia em relação ao grupo controle (controle (n-5) $0,066 \pm 0,019$, isquemia (n-5) $0,072 \pm 0,026$ ng/g de tecido) e também sem alterações após o uso do tenoxicam quando comparados com o grupo isquemiado (isquemia (n-5) $0,072 \pm 0,026$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-3) $0,019 \pm 0,007$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-8) $0,047 \pm 0,014$ ng/g de tecido). Os níveis de HVA não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (controle (n-6) $0,067 \pm 0,014$, isquemia (n-7) $0,055 \pm 0,009$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-3) $0,024 \pm 0,001$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-5) $0,036 \pm 0,012$ ng/g de tecido).

Como mostrado na figura 24, os níveis de 5-HIAA diminuíram de forma expressiva no grupo da isquemia em relação ao grupo controle (controle (n-7) $1,66 \pm 0,33$, isquemia (n-11) $0,67 \pm 0,17$ ng/g de tecido, $p < 0,05$, ANOVA e Dunnett), mas não sofreram interferência de nenhuma das doses do tenoxicam quando comparados com o grupo isquemiado (isquemia (n-11) $0,67 \pm 0,17$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-3) $0,31 \pm 0,02$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-9) $0,88 \pm 0,22$ ng/g de tecido). Os níveis de NE (controle (n-4) $0,45 \pm 0,11$, isquemia (n-6) $0,35 \pm 0,05$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-3) $0,23 \pm 0,12$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-8) $0,24 \pm 0,03$ ng/g de tecido) e 5-HT (controle (n-11) $0,31 \pm 0,04$, isquemia (n-12) $0,36 \pm 0,03$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-3) $0,25 \pm 0,02$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-9) $0,27 \pm 0,08$ ng/g de tecido) não mostraram diferenças entre os grupos.



Monoaminas e metabólitos

Figura 23. Efeitos do tenoxicam sobre os níveis de DA, DOPAC e HVA em hipocampo de ratos idosos. Os animais (n- 4-7) foram tratados com dose única de tenoxicam 2,5 ou 10 mg/kg i.p. após 45 min de oclusão carotídea e sacrificados após os 24 horas de reperfusão para a determinação das monoaminas. Os valores foram expressos como média \pm EPM. a: vs controle, $p < 0.01$, b: vs isquemia, c : vs isquemia, $p < 0.01$, ANOVA e teste de Dunnett como teste positivo.

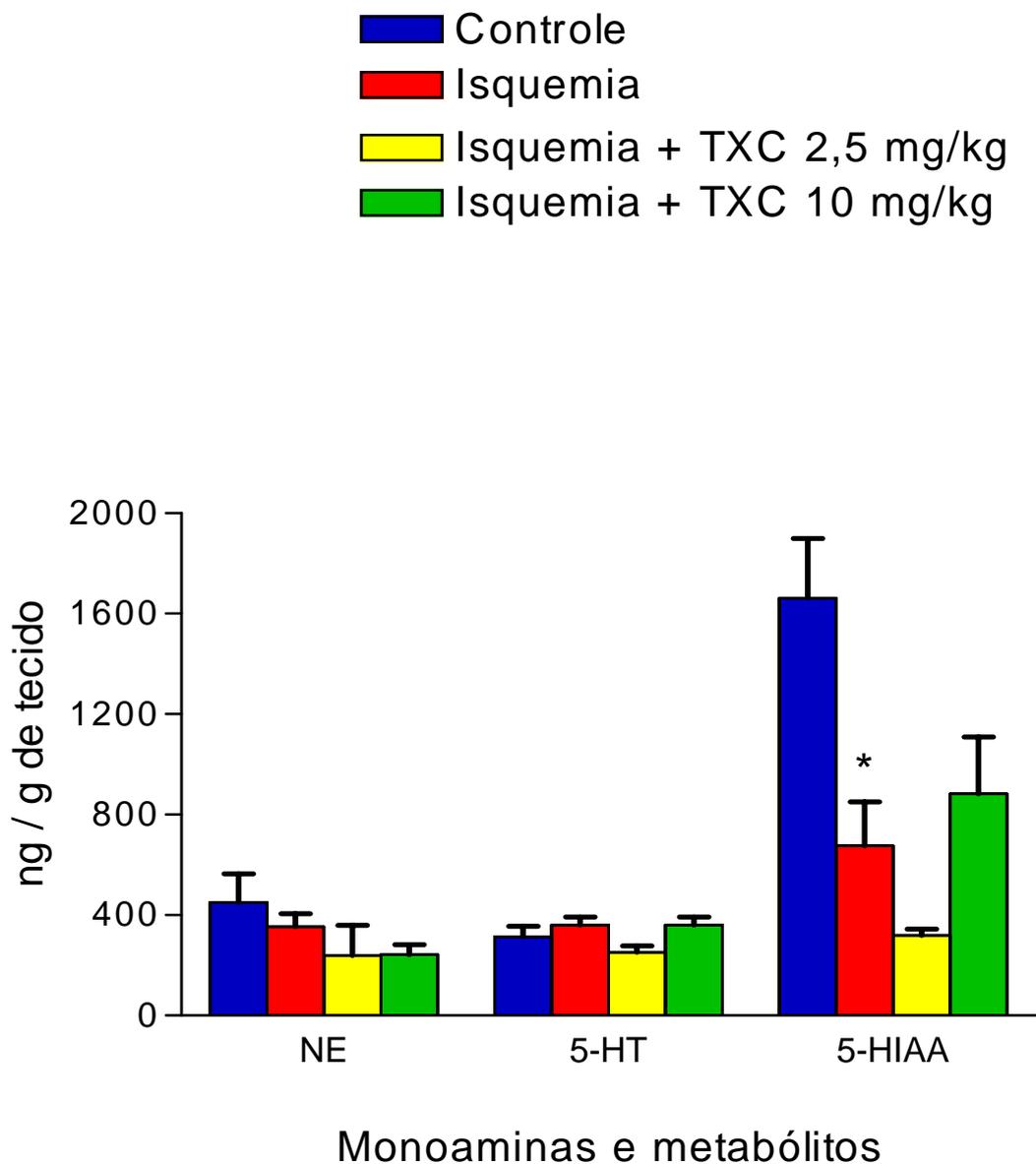


Figura 24. Efeitos do tenoxicam sobre os níveis de NE, 5-HT e 5-HIAA em hipocampo de ratos idosos. Os animais (n- 4-11) foram tratados com dose única de tenoxicam 2,5 ou 10 mg/kg i.p. após 45 min de oclusão carotídea e sacrificados com 24 horas de reperfusão para a determinação das monoaminas. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * vs controle, $p < 0.05$, ANOVA e teste de Dunnett como teste positivo.

4.5. Efeitos do tenoxicam nas concentrações de AAES em hipocampus de ratos idosos após isquemia-reperfusão

As concentrações de glutamato e aspartato após isquemia e reperfusão e após o tratamento com tenoxicam com uma dose única de 2,5 ou 10 mg/kg estão apresentados na tabela 2. Os níveis de glutamato mostraram importante elevação no grupo isquemia em relação ao grupo controle (controle (n-5) $479,3 \pm 80,79$, isquemia (n-5) $1.004 \pm 37,80$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.01$, ANOVA e Dunnett). O grupo tratado com a dose de 10 mg/kg de tenoxicam demonstrou aumento significativo dos níveis de glutamato em relação ao grupo isquemiado (isquemia (n-5) $1.004 \pm 37,80$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-5) $1.315 \pm 42,92$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett). O grupo tratado com a dose de 2,5 mg/kg de tenoxicam (isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $1.068 \pm 93,01$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) e o controle tratado com tenoxicam 10 mg/kg (controle + TXC 10 mg/kg (n-5) $1.257 \pm 52,33$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) não apresentaram diferenças em relação aos demais grupos. Os níveis de aspartato também apresentaram aumento no grupo isquemiado quando comparado com o grupo controle para valores significativos (controle (n-5) $1.253 \pm 256,1$, isquemia (n-5) $2.382 \pm 184,5$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.01$, ANOVA e Dunnett). O tenoxicam não apresentou efeito nos níveis de aspartato em nenhuma das doses (isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $2.411 \pm 232,9$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-5) $2.304 \pm 217,6$, controle + TXC 10 mg/kg (n-5) $2.268 \pm 242,4$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

Tabela 2. Concentrações de glutamato e aspartato no hipocampo de ratos idosos submetidos à isquemia cerebral transitória na presença e ausência de tenoxicam (2,5 e 10 mg/kg, i.p.)

Grupos	Concentrações ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)	
	Glutamato	Aspartato
Controle	497,3 \pm 80,79	1253\pm256,1
Isquemia	1004,0 \pm 37,80*	2382\pm184,5*
Isquemia + TXC 2,5 mg/kg	1068,0 \pm 93,01	2411\pm232,9
Isquemia + TXC 10 mg/kg	1315,0 \pm 42,92**	2304\pm217,6
Controle + TXC 10 mg/kg	1257,0 \pm 52,33	2268\pm242,4

As determinações de Glutamato e Aspartato foram realizadas por HPLC com detecção fluorimétrica (ver materiais e métodos). Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo foi de 5. * vs controle, $p < 0.01$, ** vs isquemia, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo.

4.6. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 1 hora.

Os níveis de ATP são demonstrados na figura 25, onde se observa uma diminuição significativa desses níveis no grupo isquemia com reperfusão de 1 hora em comparação com o grupo controle (controle (n-4) $0,3321 \pm 0,077$, isquemia (n-6) $0,1823 \pm 0,0281$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett) como teste positivo. O tratamento com tenoxicam na dose de 2,5 mg/kg atenuou os níveis de ATP no grupo reperfundido por 1 hora quando comparado com o grupo isquemia (isquemia (n-6) $0,1823 \pm 0,0281$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $0,0492 \pm 0,0082$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett). O tenoxicam não alterou os níveis de ATP nos grupos controle e isquemiado tratados com a dose de 10 mg/kg (controle + TXC 10 mg/kg (n-4) $0,0942 \pm 0,0299$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-4) $0,0645 \pm 0,0068$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

Na figura 26, são observados os efeitos da isquemia e do tenoxicam nos níveis de lactato nos animais reperfundidos por 1 hora. Não houve, entretanto, diferença nos níveis de lactato entre os grupos de ratos idosos que sofreram isquemia cerebral transitória por 45min e reperfusão de 1 hora quando comparados com os animais do grupo controle, do grupo isquemiado tratado com 2,5 ou 10 mg/kg de tenoxicam ou do grupo controle tratado (controle (n-6) $10,81 \pm 0,55$, isquemia (n-6) $10,55 \pm 2,30$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $7,11 \pm 0,63$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-6) $9,04 \pm 1,58$, controle + TXC 10 mg/kg (n-4) $6,54 \pm 2,14$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

Os níveis de piruvato em ratos idosos submetidos à isquemia e reperfusão de 1 hora demonstrados na figura 27 indicam uma diminuição significativa no grupo isquemiado em relação ao grupo controle (controle (n-5) $16,62 \pm 2,38$, isquemia (n-6) $9,46 \pm 1,93$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo. Não houve diferença nos grupos isquemiados tratados com tenoxicam nas doses de 2,5 ou 10 mg/kg ou no controle tratado com a dose de 10 mg/kg (controle + TXC 10 mg/kg (n-4) $10,28 \pm 1,37$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $7,03 \pm 1,14$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n=4) $9,33 \pm 4,60$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

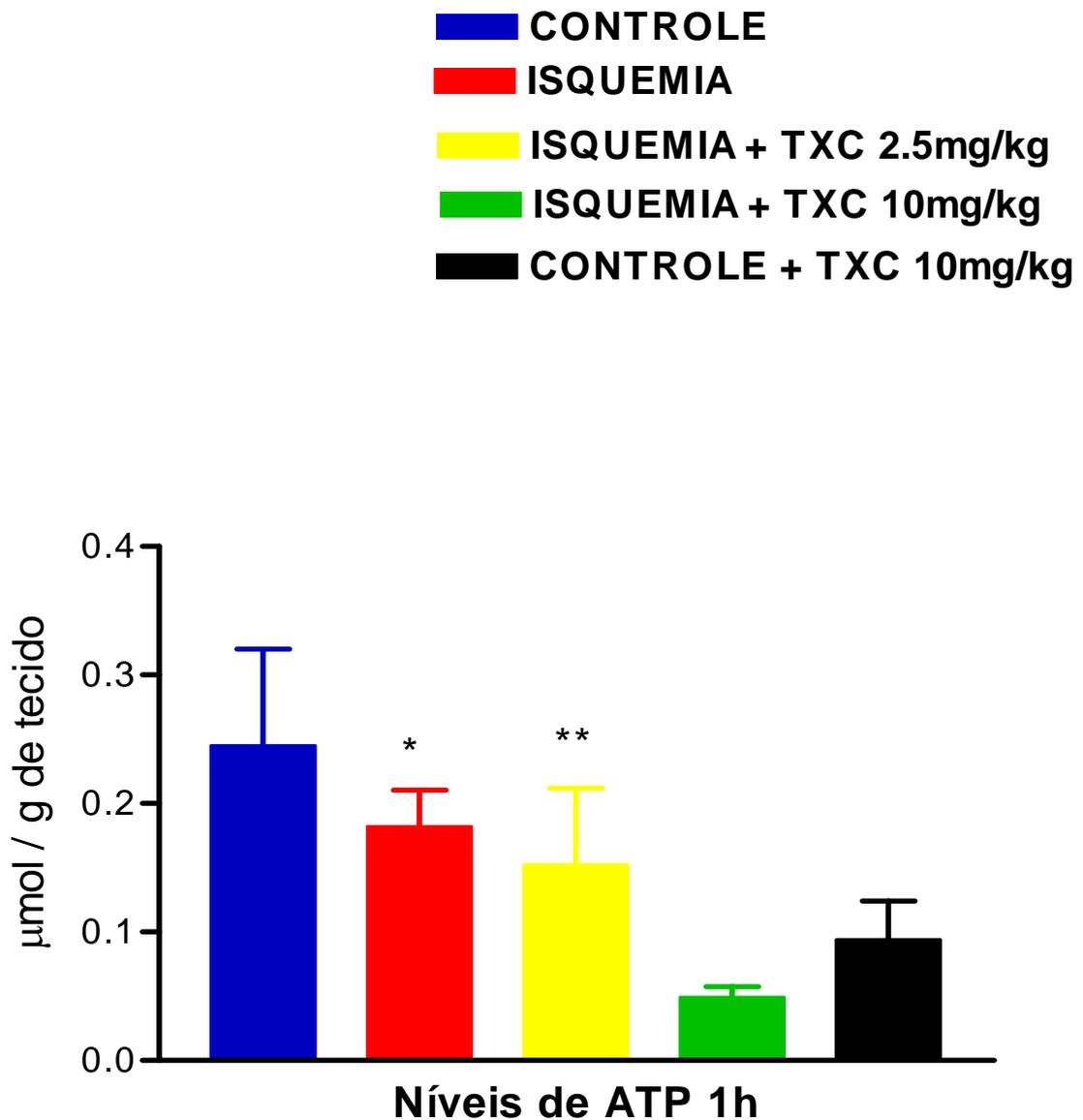


Figura 25. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora de reperfusão e os hipocampus dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo variou de 4 a 6. * vs controle, ** vs isquemia, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo.

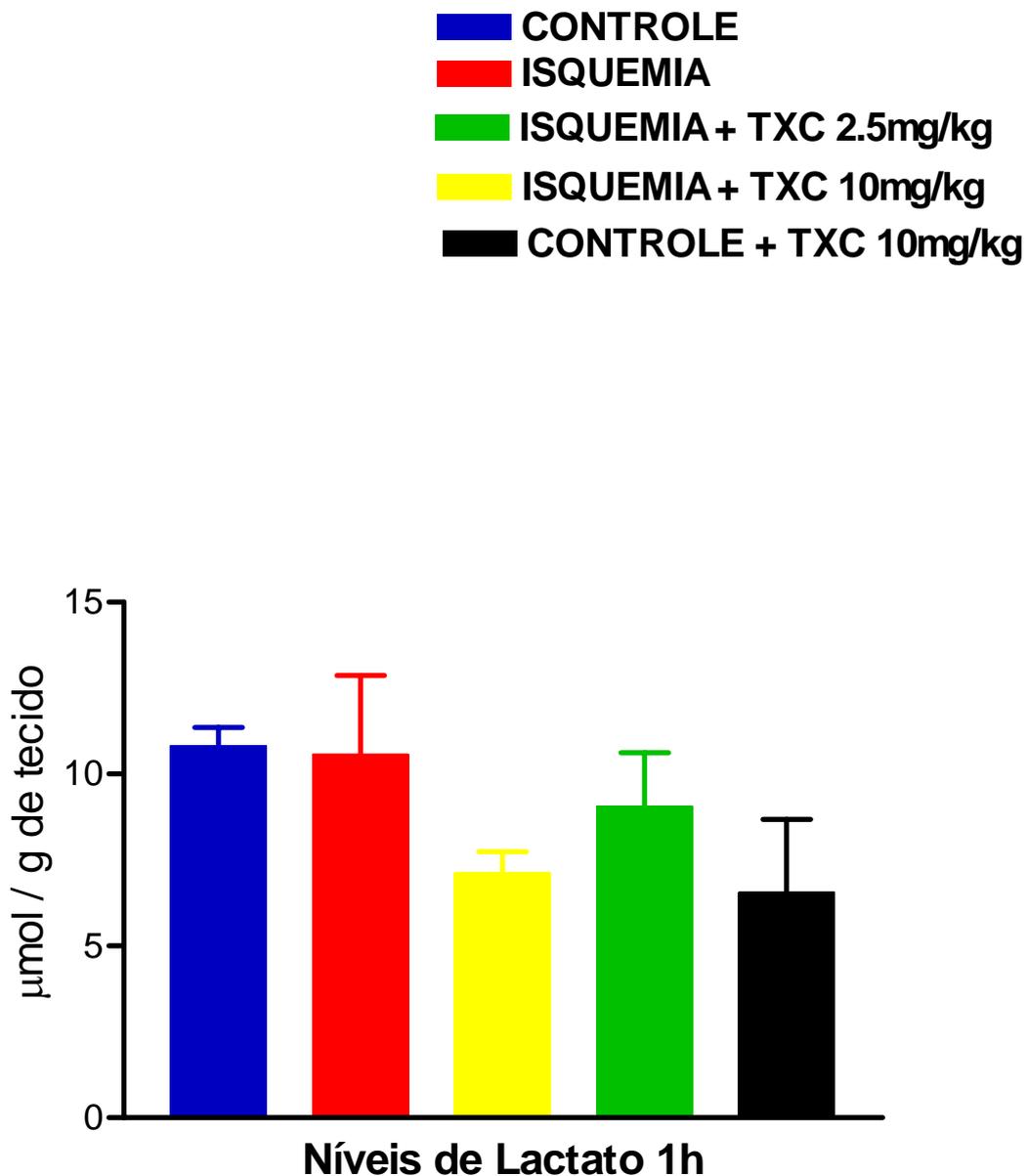


Figura 26. Efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora de reperfusão e os hipocampos dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo variou de 4 a 6.

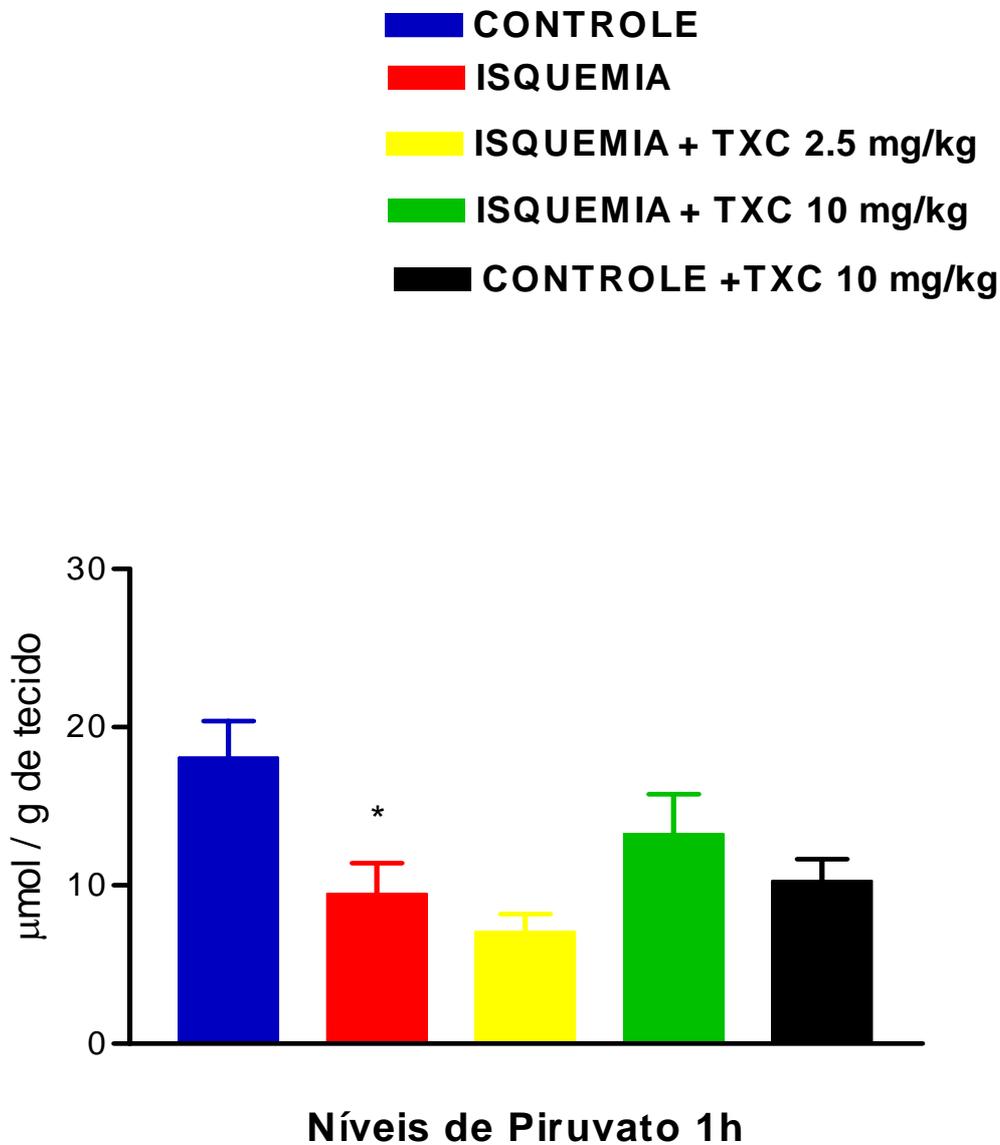


Figura 27. Efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 1 hora. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora de reperfusão e os hipocampus dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo variou de 4 a 6. * vs controle, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo.

4.7. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 24 horas

Nos animais submetidos à isquemia seguida de reperfusão de 24 horas, os níveis de ATP demonstrados na figura 28 não mostram diferenças significativas entre os grupos (n-5), sem alterações, portanto, ocasionadas pela isquemia-reperfusão 24 horas ou pelo tratamento com tenoxicam, seja na dose de 2,5 ou na dose de 10 mg/kg (controle $0,5222 \pm 0,1222$, isquemia $0,8989 \pm 0,3393$, controle + TXC 10 mg/kg $0,8989 \pm 0,2548$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg $0,3351 \pm 0,1047$, isquemia + TXC 10 mg/kg $0,6086 \pm 0,1164$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

Em relação aos níveis de determinados medidos em hipocampo de animais submetidos à isquemia com reperfusão de 24 horas, a figura 29 mostra os valores de cada grupo, não havendo alterações significativas entre o grupo controle, isquemia, isquemia tratado com tenoxicam nas doses de 2,5 ou 10 mg/kg ou no grupo controle tratado com tenoxicam 10 mg/kg (controle (n-4) $15,40 \pm 2,09$, isquemia (n-5) $17,94 \pm 5,47$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $8,05 \pm 2,76$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-5) $17,27 \pm 2,32$, controle + TXC 10 mg/kg (n-5) $6,81 \pm 1,69$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

Na figura 30, os níveis de piruvato nos grupos de animais que foram submetidos a 24 horas de reperfusão após 45 min de oclusão carotídea bilateral não demonstram alterações importantes após o período de isquemia-reperfusão quando comparados com valores controle (controle (n-5) $3,52 \pm 0,30$, isquemia (n-5) $5,31 \pm 0,87$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido). O tenoxicam na dose de

2,5 mg/kg apresentou diminuição significativa dos níveis de piruvato em relação ao grupo isquemiado (isquemia (n-5) $5,31 \pm 0,87$, isquemia + TXC 2,5 mg/kg (n-5) $2,58 \pm 0,62$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, $p < 0,05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo). O tenoxicam na dose de 10 mg/kg não alterou os níveis de piruvato no grupo isquemiado tratado quando comparado com o grupo isquemiado (isquemia (n-5) $5,31 \pm 0,87$, isquemia + TXC 10 mg/kg (n-5) $4,27 \pm 0,88$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido) e também não alterou os níveis de piruvato no grupo controle tratado em comparação com o grupo controle (controle (n-5) $3,52 \pm 0,30$, controle + TXC 10 mg/kg (n-5) $2,27 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido).

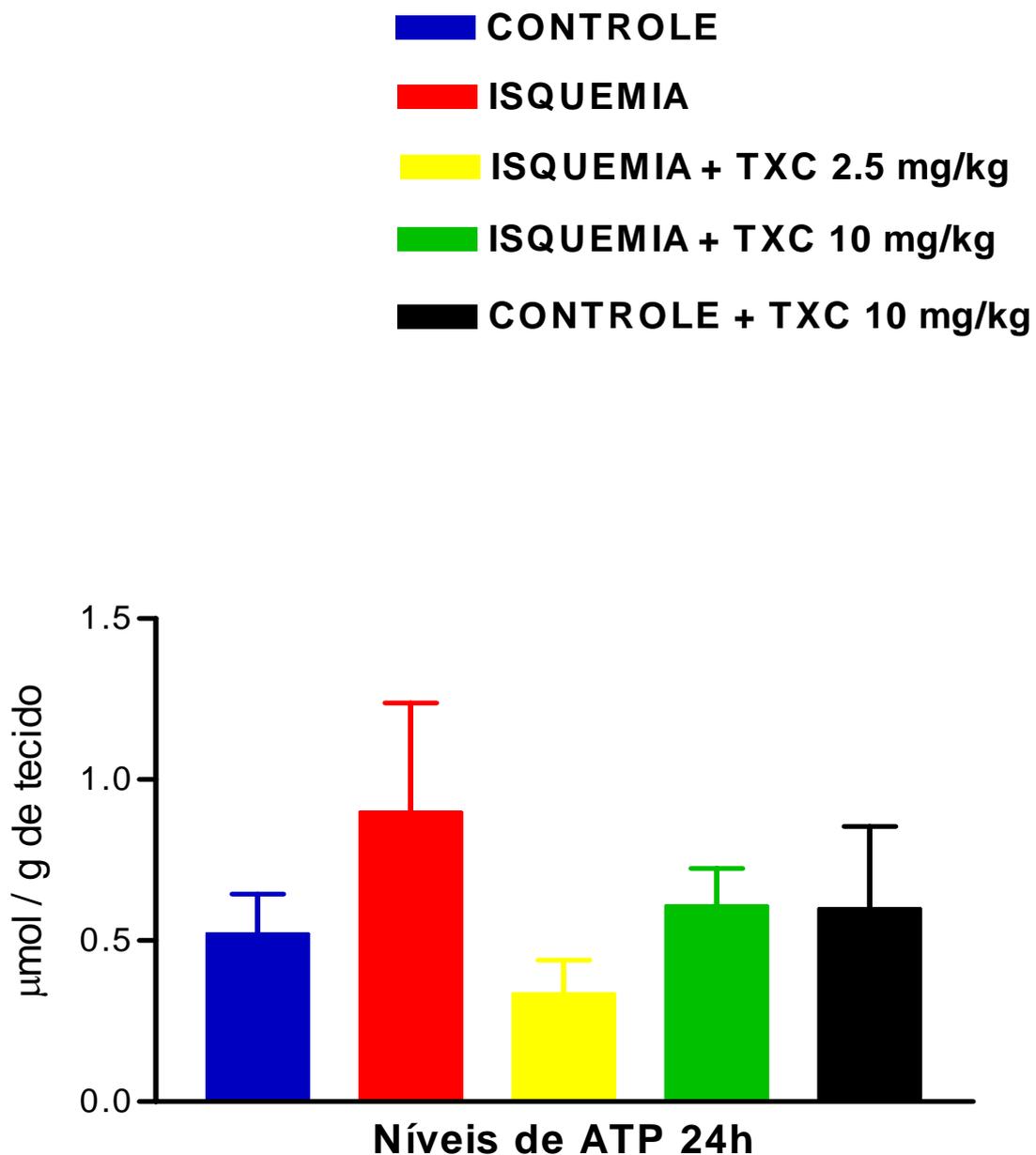


Figura 28. Efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 24 hora de reperfusão e os hipocampos dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo foi de 5.

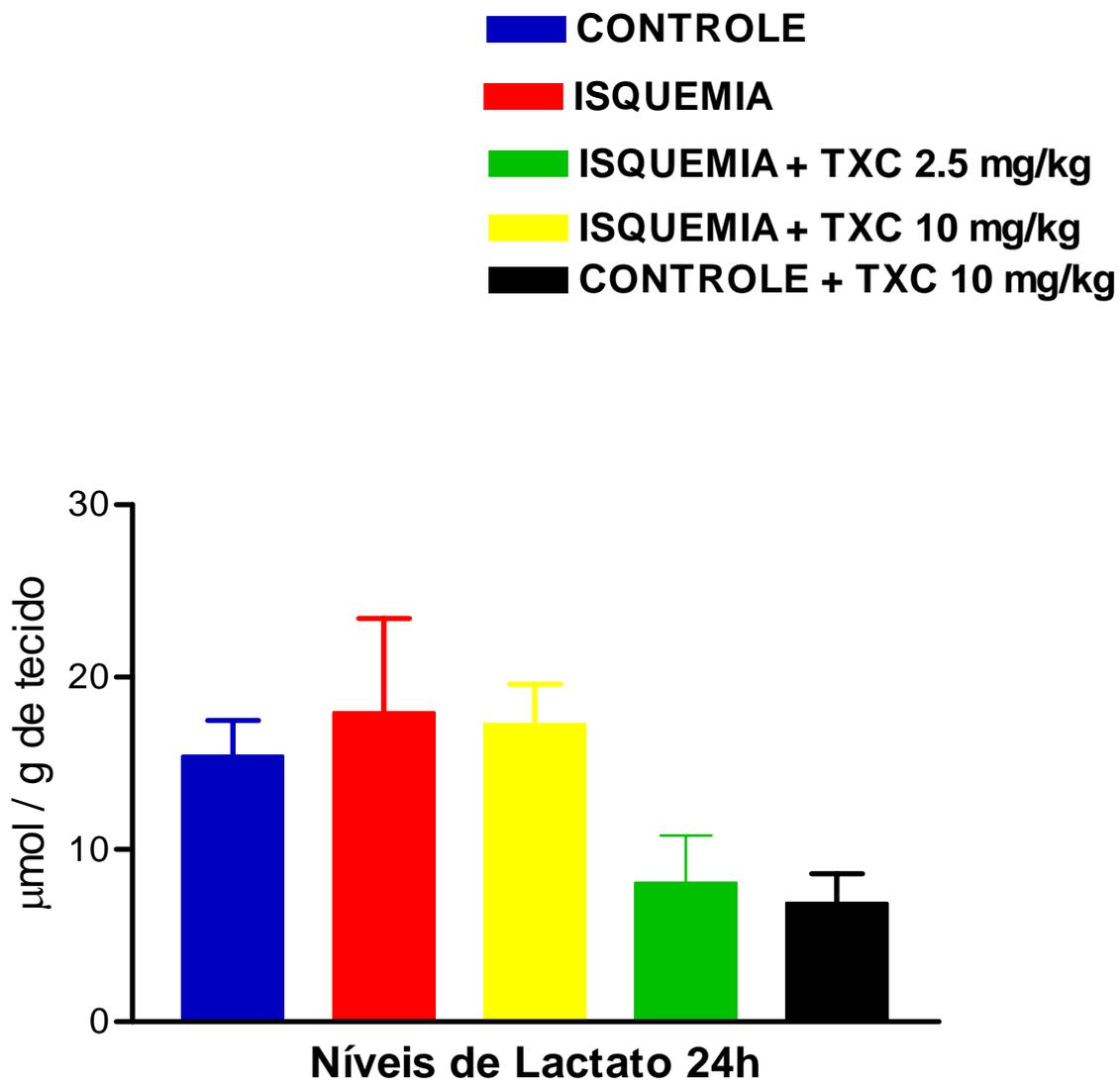


Figura 29. Efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 24 hora de reperfusão e os hipocampos dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo variou de 4 a 5.

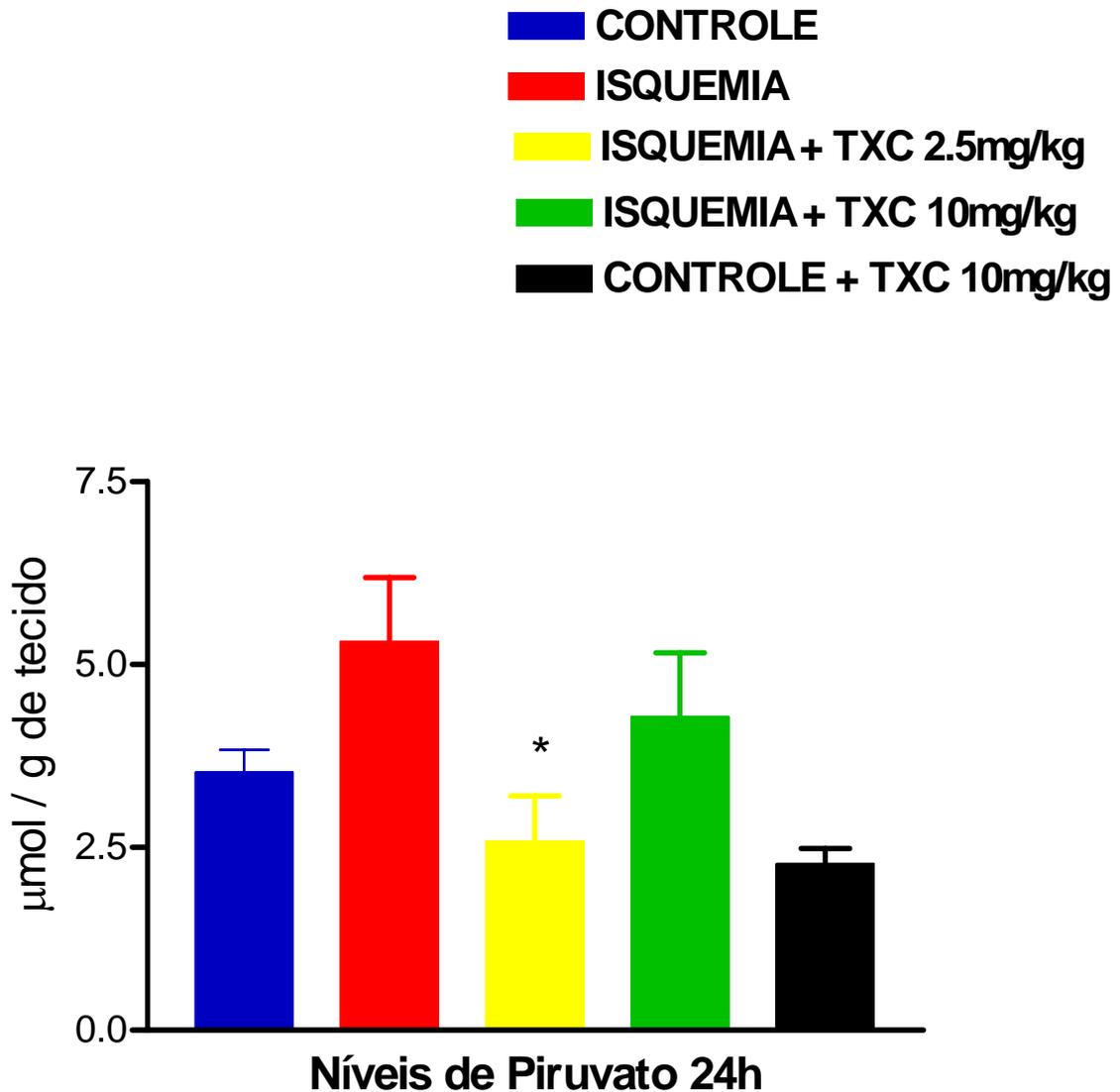


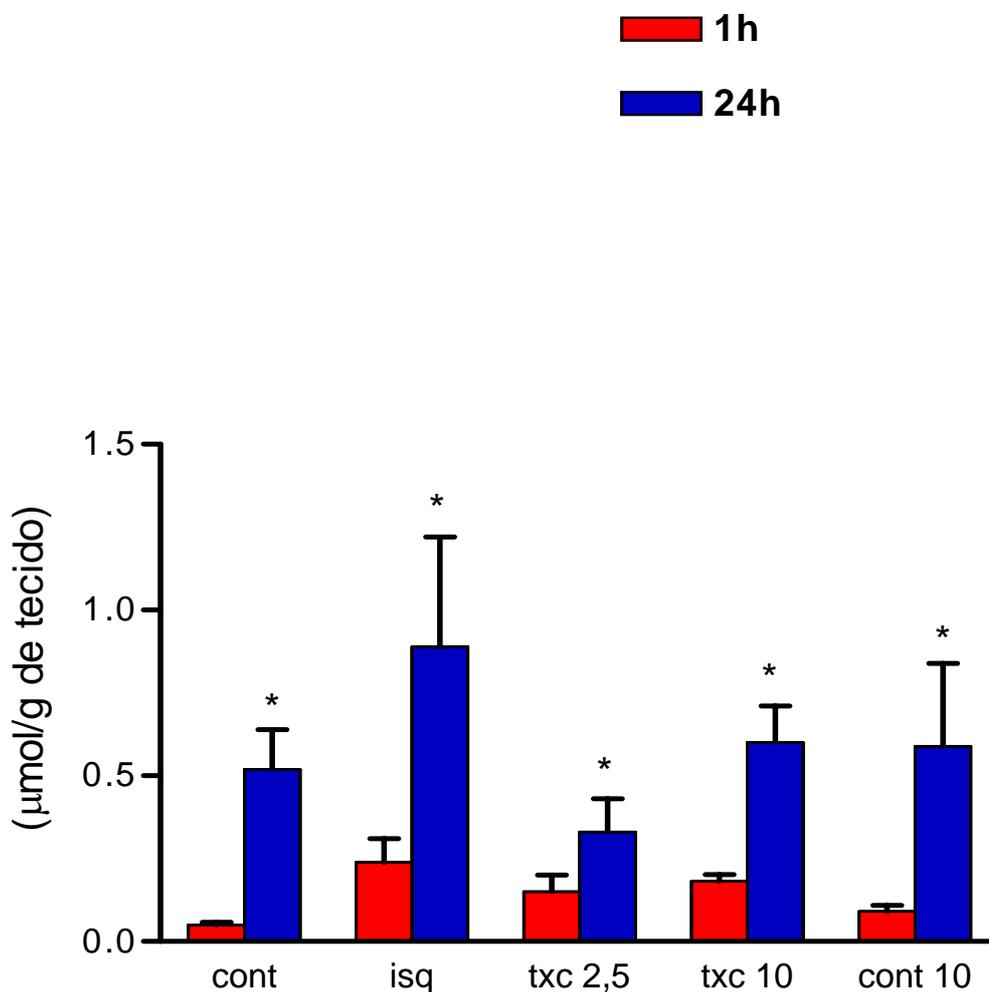
Figura 30. Efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral transitória e tempo de reperfusão de 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 24 hora de reperfusão e os hipocampos dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. O número de animais por grupo foi de 5. * vs isquemia, $p < 0.05$, ANOVA e Dunnett como teste positivo.

4.8. Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP, lactato e piruvato em hipocampos de ratos idosos submetidos à isquemia com reperfusão de 1 hora e 24 horas

Como os níveis dos metabólitos ATP, lactato e piruvato variam de acordo com o tempo de reperfusão, foi feita uma comparação desses valores entre os dois grupos com diferentes tempos de reperfusão. Na figura 31, comparamos os níveis de ATP nos grupos de animais submetidos à isquemia seguida de reperfusão por 1 hora e nos grupos de animais com isquemia seguida de reperfusão por 24 horas e observamos que houve um aumento significativo nos níveis de ATP após a reperfusão de 24 horas ($p < 0.05$, teste t não pareado)

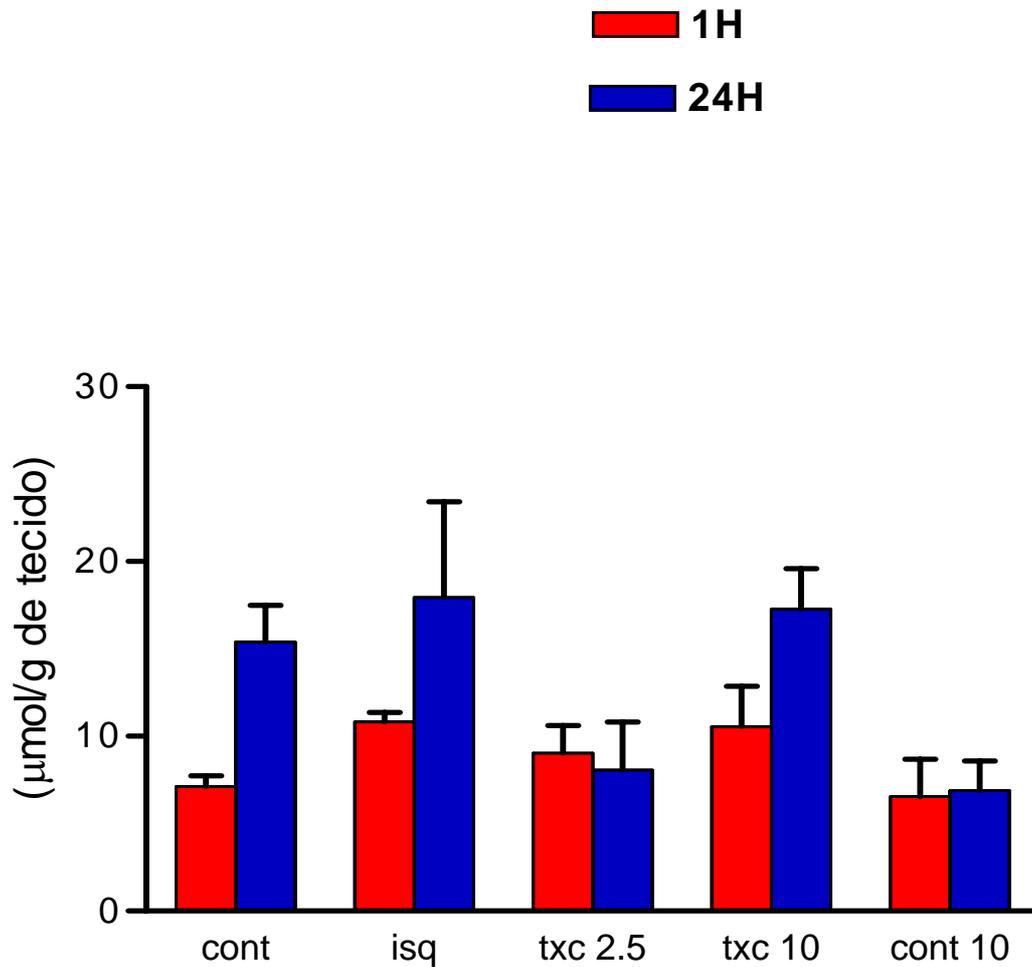
Não houve diferenças significativas nos níveis de lactato quando comparados os grupos de reperfusão de 1 hora e 24 horas, como demonstrado na figura 32.

Em relação aos níveis de piruvato nestes dois grupos, a figura 33 mostra redução importante dos níveis de piruvato no grupo submetido à reperfusão por 24 horas quando comparado ao grupo com reperfusão de 1 hora ($p < 0.05$, teste t não pareado).



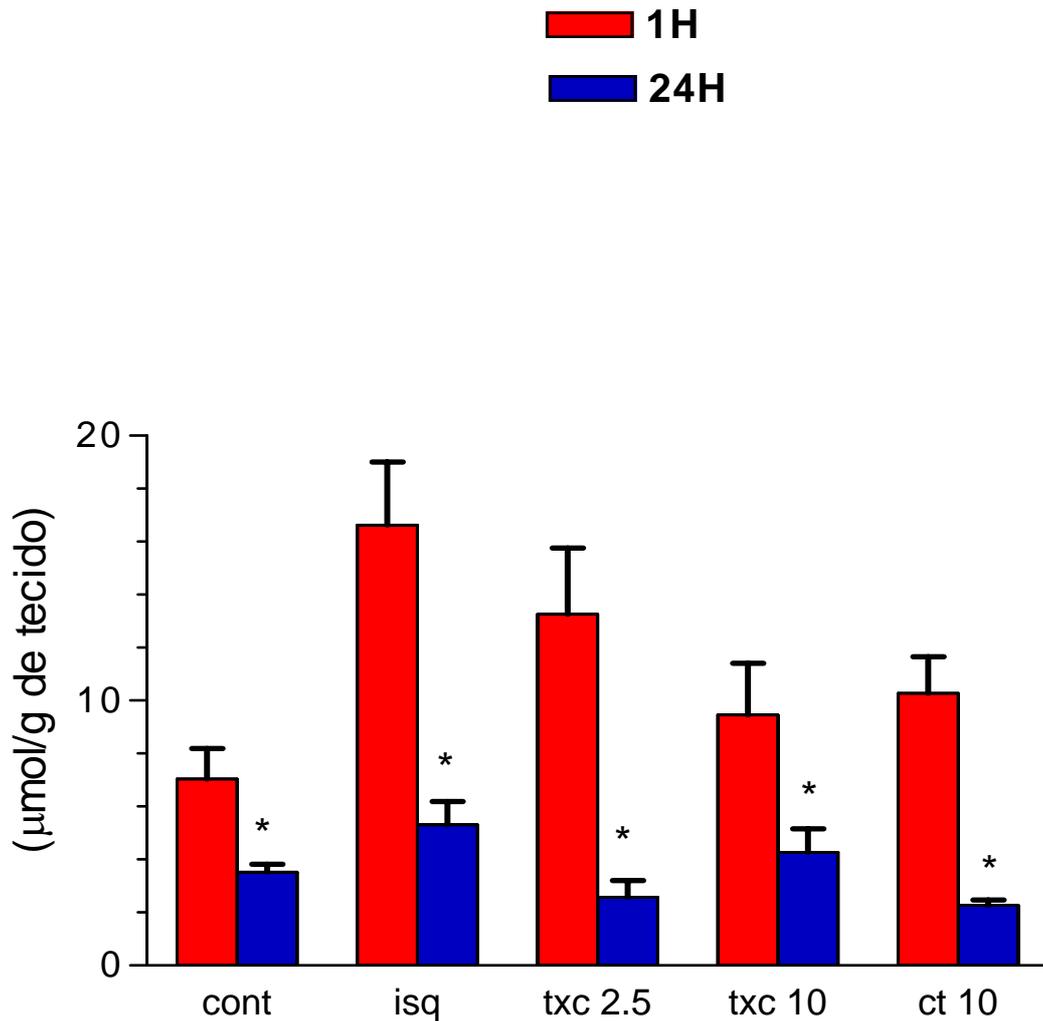
Níveis de ATP 1h/24h

Figura 31. Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de ATP em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de reperfusão de 1 e 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora ou 24 horas de reperfusão e os hipocampus dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. * vs 1 hora, $p < 0.05$, teste t não pareado.



Níveis de Lactato 1h/24h

Figura 32. Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de lactato em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de perfusão de 1 e 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora ou 24 horas de perfusão e os hipocampos dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM.



Níveis de Piruvato 1h/24h

Figura 33. Comparação dos efeitos do tenoxicam nos níveis de piruvato em ratos idosos com isquemia cerebral e tempo de reperfusão de 1 e 24 horas. Os animais expostos à oclusão carotídea bilateral foram sacrificados após 1 hora ou 24 horas de reperfusão e os hipocampus dissecados para a análise. Os dados são expressos como média \pm EPM. * vs 1 hora, $p < 0.05$, teste t não pareado.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O dano mediado pela inflamação na DVCI é uma forte evidência de que o processo inflamatório e citocinas relacionadas têm um papel chave na injúria cerebral secundária após isquemia-reperusão (Emsley & Tyrrell, 2002; Lindsberg et al., 2000; Siesjö & Siesjö, 1996). De fato, a associação entre altas concentrações de marcadores inflamatórios no sangue com deterioração neurológica precoce e pobre recuperação funcional em pacientes com infartos lacunares já foi demonstrada (Castellanos et al., 2002). Há um número de mecanismos pelos quais a ativação de leucócitos pode exacerbar o dano isquêmico ao cérebro. Existem evidências na literatura demonstrando oclusão de microvasos sob condições de baixo fluxo (Del Zoppo et al., 2000; Iadecola et al., 1996). A expressão de moléculas de adesão e de fatores quimiotáticos levam à aderência de neutrófilos ao endotélio, contribuindo para a obstrução microvascular, prejudicando o fluxo sanguíneo e permitindo a migração de leucócitos para o parênquima cerebral (Figura 16). Os leucócitos ativados liberam proteases, citocinas, PAF e radicais livres. Todos esses eventos contribuem para a lesão neuronal e glial na DVCI.

Através de estudo com micrografia eletrônica foram demonstradas alterações endoteliais de pequenas artérias cerebrais em ratos submetidos à recirculação após OACM direita com achados variando de pequenas áreas de desnudação endotelial com agregação e adesão plaquetária nos tecidos subendoteliais expostos, mitocôndrias edemaciadas e aumento do volume citosólico até desnudação total da superfície luminal do endotélio, adesão e agregação plaquetária com deposição de fibrina na membrana basal subendotelial exposta, células musculares lisas necróticas e algumas artérias

ocluídas por trombos. A gravidade das lesões variou com o tempo de exposição à isquemia seguida de reperfusão, sendo maior a área de lesão quanto maior o período isquêmico. No grupo submetido a até 6 horas de isquemia mas sem reperfusão, não foi observada desnudação endotelial, reforçando que o dano secundário do processo isquêmico é associado ao restabelecimento do fluxo sanguíneo (Nishigaya et al., 1991).

O dano vascular resultaria, portanto, da formação de radicais livres devido a uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial quando o oxigênio é novamente fornecido às paredes vasculares danificadas pela isquemia. A produção de radicais livres estaria associada ainda à cascata isquêmica desencadeada pelo glutamato e Ca^{2+} e ativação de enzimas lisossomais, à ação da enzima fosfolipase A2 em lipídios de membrana celular, liberando AA e levando à produção de eicosanóides pró-inflamatórios e vasoativos (TXA2, PGs, LTs) pela atividade enzimática da COX, principalmente pela COX-2 que é supra-regulada na DVCI (Sairanen et al., 1998; Pantoni et al., 1998) (Figura 14). A expressão de NOSi detectada por imunocitoquímica também foi revelada, principalmente na parede dos vasos da região isquêmica e em células polimorfonucleares e mononucleares invadindo o tecido isquêmico (Iadecola et al., 1996).

As alterações histológicas associadas à isquemia cerebral refletem o processo degenerativo neuronal e glial decorrentes da lesão isquêmica e reperfusão. Com a progressão da degeneração, os neurônios tornam-se encarquilhados, exibindo tipicamente, à microscopia ótica, núcleos picnóticos e citoplasma eosinofílico e, finalmente, perda celular completa, com a maioria dos neurônios desenvolvendo estes achados histológicos claros do dano

isquêmico entre 6 e 24 horas de reperfusão (Pulsinelli et al., 1982) Alterações patológicas neuronais decorrentes de isquemia experimental em ratos são demonstradas na região do hipocampo, com neurônios encarquilhados (“dark neurones”) e citoplasma denso (Ostrowski, 1998). A infiltração de neutrófilos nas áreas isquêmicas após reperfusão foi evidenciada (Yamasaki et al., 1997). A presença de células inflamatórias foi também observada no estriato de animais submetidos à isquemia-reperfusão mas não foi documentada em animais controle (Hwang et al., 2002). Estes achados corroboram a participação das células inflamatórias no cérebro pós-isquêmico, contribuindo para o dano neuronal secundário.

A nossa análise histológica pelo método hematoxilina-eosina em hipocampo de ratos idosos submetidos à oclusão carotídea bilateral por 45 min seguida de 24 horas de reperfusão demonstrou alterações semelhantes àquelas já documentadas, com presença de vacuolização intensa, encarquilhamento neuronal e também a presença de células inflamatórias. Estas características não foram observadas nos animais falso-operados. No grupo com isquemia-reperfusão tratado com tenoxicam na maior dose, constatamos a atenuação expressiva destes achados, com mínima vacuolização e encarquilhamento, confirmando de fato a participação da cascata inflamatória na fase de reperfusão pós-isquêmica e o potencial efeito benéfico da ação anti-inflamatória do tenoxicam neste modelo de isquemia-reperfusão, apesar da reversibilidade proporcionada não ter tido significância estatística, possivelmente pela amostra pequena de animais por grupo (n-3).

No presente trabalho, a utilização de um modelo de isquemia cerebral global transitória através da ligadura de ambas as artérias carótidas

comuns em ratos idosos por um período de 45 minutos seguido de 24 horas de reperfusão, resultou no aumento significativo da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) considerada como um marcador de neutrófilos e de processo inflamatório. Estes valores estão de acordo com estudos prévios que documentam achados semelhantes, confirmando a participação de neutrófilos no processo isquêmico. Assim, estudo recente utilizando um inibidor de serina-protease (serpinas) produzido por engenharia genética recombinante em ratos submetidos à OACM durante 30 min e seguida de 24 horas de reperfusão, evidenciou um aumento da atividade de MPO no grupo isquêmico que foi revertido pelo uso do inibidor da protease de forma significativa. As serpinas regulam a atividade de serinas-proteases derivadas de células inflamatórias que participam em muitos processos enzimáticos. A atividade de MPO contra-lateral à oclusão arterial não se mostrou alterada. Estes achados reforçam a participação de proteases liberadas por neutrófilos ativados infiltrando o hemisfério isquemiado (Weaver et al., 2002).

A associação entre a geração de radicais livres e inflamação foi demonstrada em gerbils sujeitos à oclusão carotídea bilateral seguida de reperfusão. O tratamento dos gerbils com o anti-oxidante tempol atenuou de forma significativa o expressivo aumento da atividade de MPO em hipocampus, causado pela isquemia cerebral e reperfusão, sugerindo a co-participação do estresse oxidativo e do processo inflamatório no dano cerebral isquêmico (Cuzzocrea et al., 2000). A quantificação da infiltração de células inflamatórias através das determinações da atividade da MPO (que é localizada principalmente em grânulos primários de neutrófilos) foi também realizada para analisar o uso do HHDT (Hwangryun-Hae-Dok-tang), um extrato da medicina chinesa tradicional com propriedades inibitórias para

reações inflamatórias mediadas por neutrófilos, em um modelo experimental de isquemia cerebral transitória em ratos. O uso do extrato suprimiu significativamente a atividade da MPO no tecido cerebral pós-isquêmico (Hwang et al., 2002).

Em nosso estudo, a reversão do aumento da atividade enzimática da MPO por ambas as doses de tenoxicam no grupo submetido à isquemia-reperfusão corrobora as evidências de que a inflamação é fortemente envolvida no dano neuronal secundário à perfusão pós-isquemia. De modo semelhante aos outros AINES, o tenoxicam inibe a atividade da COX impedindo a formação de produtos da reação do AA, diminuindo, portanto, indiretamente a infiltração de neutrófilos ativados por diminuir a formação de PGs e TXA2 que funcionariam como estímulos para a produção de citocinas, quimocinas e PAF. Muitos estudos experimentais também têm sido feitos para demonstrar que a modulação da participação dos leucócitos na lesão da isquemia-reperfusão, através da inibição de mediadores tais como quimocinas, PAF e moléculas de adesão (ICAM-1; integrinas), pode influenciar a magnitude do dano resultante para o cérebro.

O pré-tratamento de ratos sujeitos à isquemia focal transitória com um anticorpo anti- $\alpha 4$ integrina reduziu a extensão do infarto cerebral e a atividade da MPO medidos 23 horas após 60 min de OACM, demonstrando inequivocamente o papel funcional da $\alpha 4$ integrina na patogênese do dano cerebral isquêmico. A inibição da adesão leucocitária pode reduzir o dano cerebral por prevenção do fenômeno de “no-reflow” e hipoperfusão pós-isquêmica, em que a microvasculatura é obstruída por leucócitos que liberam mediadores vasoativos e causam injúria direta das células endoteliais (Figura

9). A inibição da adesão também resulta na diminuição da transmigração de leucócitos na região isquemiada do SNC como demonstrado pela habilidade do anticorpo anti- α 4 integrina em reduzir a atividade da MPO no tecido isquêmico (Relton et al., 2001; Becker et al., 2001). A atividade da MPO foi também positivamente correlacionada com o volume de infarto cerebral em grupos submetidos a um modelo de OACM seguida de reperfusão em ratos tratados com anticorpo anti-ICAM-1 e sugere, não somente que a atividade da MPO é um índice significativo para dano cerebral, mas também que a prevenção da inflamação atenua a injúria decorrente do processo de isquemia-reperfusão (Kanemoto et al., 2002).

Em relação ao papel das quimocinas no processo inflamatório isquêmico cerebral, interessante estudo de isquemia cerebral focal foi realizado em camundongos no qual o fluxo sanguíneo cerebral regional no core isquêmico foi monitorizado por laser-Doppler fluxometria e os animais nos quais o fluxo sanguíneo foi reduzido a menos de 25% durante a oclusão e recuperado em mais de 65% na reperfusão foram avaliados para infiltração leucocitária através da determinação de MPO por imunohistoquímica. Um antagonista para receptor de quimocina C-C foi administrado via intravenosa nos 10 min precedendo a oclusão arterial. Neste estudo, a infiltração leucocitária investigada imunohistoquimicamente usando um anticorpo anti-MPO após 48 horas de reperfusão não demonstrou diferenças significantes no número de células MPO-positivas entre o grupo isquemiado e o grupo tratado com o antagonista de receptor para quimocina C-C, mas evidenciou uma diminuição no número de macrófagos/monócitos ativados na penumbra isquêmica determinado pelo uso de um marcador imunohistoquímico para macrófago/micróglia ativados (anticorpo anti-Mac-1- α). Esse fato pode ser

devido à seletividade do antagonista de receptor de quimocina C-C para subtipos de receptores expressos principalmente em macrófagos/micróglia.

Outro fato interessante deste estudo foi evidenciar a ação do antagonista de receptor de quimocina na zona de penumbra isquêmica, apesar da sua administração endovenosa, o que sugere que a BHE é danificada durante o processo de isquemia cerebral transitória, permitindo a passagem de macromoléculas como anticorpos (Takami et al., 2002). Já o bloqueio da quimioatração neutrofílica induzida por citocina no dano cerebral isquêmico transitório em ratos pelo uso do anticorpo anti-CINC (citocina indutora de quimioatração neutrofílica) diminuiu a formação de edema cerebral e a atividade da MPO nas áreas isquêmicas, indicando que a invasão de neutrófilos nas áreas isquêmicas é nociva e envolvida na injúria cerebral pós-isquêmica e que inibição deste processo infiltrativo nos estágios precoces da reperfusão pode minimizar o dano neuronal (Yamasaki et al., 1997).

Essas evidências são reforçadas em estudo que demonstra deposição de neutrófilos em cérebro após isquemia transitória em ratos com hiperglicemia pré-isquêmica, através da determinação de MPO pela técnica de imunohistoquímica. Os resultados deste estudo mostraram células MPO-positivas tanto no parênquima cerebral como nos vasos piaais, células MPO-positivas aderentes ao endotélio e ocluindo capilares (Lin et al., 2000).

O aumento na população de granulócitos no cérebro isquêmico com pico em aproximadamente 24 horas após a isquemia também foi verificado pela utilização de análise por citometria de fluxo de células inflamatórias, em um modelo de isquemia cerebral focal permanente em ratos, demonstrando

que o processo inflamatório não somente ocorre também na isquemia cerebral transitória (Campanella et al., 2002). Este achado surpreende quando se observa a literatura na qual a maioria dos resultados mostra que o processo inflamatório associado à isquemia acontece na fase de reperfusão. O influxo de leucócitos e plaquetas foi também exibido em infarto cerebral em evolução (Garcia et al., 1994). Todos esses achados substanciam o papel chave desenvolvido pelos neutrófilos e mediadores inflamatórios e contribuindo para a lesão isquêmica e para a extensão do infarto e assim acentuando o dano cerebral.

Em relação aos níveis de nitrito, que reflete indiretamente a produção de NO, os resultados do presente trabalho mostraram uma elevação significativa no grupo de animais sujeito à OACB seguida de reperfusão em relação ao grupo controle, dado que corrobora os achados da literatura científica, onde já é bem documentada a participação do NO e da enzima NOSi nas reações da cascata isquêmica. Assim, em ratos submetidos à OACM por 2 horas seguida de reperfusão confirmadas por laser-Doppler fluxometria, através da técnica de imunohistoquímica para identificar células nas quais a enzima NOSi é expressa, foi demonstrada a presença de NOSi em vasos da região isquêmica e em áreas de necrose precoce. Além disso, imunoreatividade foi também observada em células mononucleares e polimorfonucleares invadindo o tecido infartado, demonstrando que o NO e a NOSi podem estar envolvidos também na reação inflamatória que segue a isquemia cerebral (Iadecola et al., 1996).

Outra evidência da co-participação da NOSi no processo inflamatório associado à isquemia/reperfusão foi apresentado em estudo no

qual a proximidade temporal e espacial da expressão da NOSi e da COX-2 foi evidenciada, sugerindo que a produção de NO pela ação da NOSi pode direcionar a atividade da COX-2 no cérebro pós-isquêmico e aumentar conseqüentemente os produtos da reação da COX-2 (Del Zoppo et al., 2000). Esta evidência é suportada pelo fato que um inibidor seletivo da NOSi reduziu os produtos da reação da COX-2 no cérebro pós-isquêmico (Nogawa et al., 1998) O papel patogênico da NOSi também foi documentado em estudo in vitro utilizando fatias de cérebro expostas à privação de oxigênio e glicose. O tempo de surgimento da atividade da NOSi neste modelo experimental foi dependente da duração do período de exposição à privação de oxigênio/glicose, onde fica evidenciado que a NOSi tem um papel patogênico importante não só nos estágios tardios de isquemia, mas também no início deste processo (De Alba et al., 1999)

Em nossos experimentos, após a administração de uma única dose de tenoxicam (2,5 e 10 mg/kg, ip), foi observada uma tendência à atenuação dos níveis de nitrito em relação ao grupo de animais isquemiados. Pelos achados já citados da possível interação da NOSi e da COX-2 na isquemia-reperfusão, é coerente que, pelo uso de um AINE como o tenoxicam em animais sujeitos à isquemia, os níveis de nitrito em parte diminuam, por inibição indireta da expressão da NOSi através da inibição da COX-2 pelo AINE e, portanto, pelo bloqueio da metabolização do AA e da formação dos seus produtos, que funcionariam como mediadores para a supra-regulação da NOSi. A supressão da formação dos produtos do AA pela COX também reduziria a formação de radicais livres associados a neutrófilos ativados e a expressão de fatores transcripcionais como o NF- κ B que também funcionam como estimuladores da expressão da NOSi (Del Zoppo et al., 2000).

Por outro lado, interessante trabalho em camundongos mostra que a magnitude da proteção da injúria cerebral isquêmica pela deleção do gene da NOSi é dependente da idade, com menor proteção em camundongos com 6 meses de idade em relação aos de 1-2 meses de idade (Nagayama et al., 1999) Essa menor proteção em animais idosos pode ser talvez relacionada a uma maior participação da produção de NO por outros sítios que não a NOSi. Já existe evidência que, com a deleção do gene da NOSi, ocorre uma indução paradoxal da expressão da isoforma NOSn que resulta numa produção aumentada de NO (Colasanti & Suzuki, 2000). Essas razões poderiam explicar porque os níveis de nitrito não reduziram mais significativamente com o uso do tenoxicam nos nossos experimentos, considerando que os animais eram idosos.

No presente trabalho os níveis de dopamina aumentaram de modo significativo após a isquemia e foi revertido com uma única aplicação de tenoxicam, tanto na dose de 2,5 como na dose de 10 mg/kg, ip. Não houve alteração importante em nenhum dos grupos nos níveis dos metabólitos HVA e DOPAC, talvez pela menor taxa de metabolização em animais idosos. Os níveis de NE e 5-HT não variaram, mas houve um aumento significativo nos níveis de 5-HIAA nos animais isquemiados em relação ao grupo controle que não se alteraram com o uso do tenoxicam. De acordo com o trabalho de Luthman e cols. (1991), os níveis de dopamina hipocampais aumentam com a isquemia, enquanto que os níveis no corpo estriado diminuem e este trabalho não evidencia alteração nos níveis de 5-HIAA e DOPAC, com uma queda nos níveis de NE e 5-HT. Essas diferenças em relação aos nossos resultados podem estar relacionadas ao fato deste trabalho utilizar gerbils adultos,

enquanto nossos experimentos utilizaram ratos com mais de 1 ano de idade. Já em outro modelo de isquemia em ratos adultos, a diminuição nos níveis de NE após isquemia se repete, mesmo com 24 horas de reperfusão, normalizando-se com 7 dias após a isquemia Iwasaki et al., 1996). Os valores inalterados de NE nos nossos estudos podem ainda ser explicados por uma atenuação nos mecanismos compensatórios à isquemia nos animais idosos, evitando as alterações agudas dos níveis de NE.

Gómez-Niño e cols. (1992) demonstraram um aumento dos níveis de catecolaminas em coelhos após o uso de inibidores da COX explicado pela ação de desacoplamento da fosforilação oxidativa dos anti-inflamatórios. Estes dados poderiam sugerir que, com o uso do tenoxicam neste modelo de isquemia, poderia haver um aumento dos níveis de NE, mas não foi o resultado obtido. Devemos considerar, no caso, as diferenças de modelos experimentais e de espécies utilizadas.

A associação de inflamação e o aumento dos níveis de NE e 5-HT do SNC foi demonstrada por Sufka & Hoganson (1993), através da indução da inflamação por uso de carragenina na aponeurose plantar de ratos. Possivelmente por interferência de sistema monoaminérgico supra-espinhal. Na inflamação associada ao processo isquêmico, a ação desse eixo pode não estar tão envolvida na resposta monoaminérgica, não produzindo as elevações dos níveis dessas monoaminas.

As concentrações extracelulares de glutamato, o neurotransmissor excitatório predominante no SNC, são normalmente mantidas em níveis muito baixos por eficientes sistemas de captação consistindo de um número

de transportadores glutamatérgicos gliais e neuronais (Robinson et al., 1997). A liberação excessiva e acúmulo extracelular de aspartato e glutamato são eventos precoces na cascata isquêmica e a neurotoxicidade desses aminoácidos excitatórios (AAEs) tem sido atribuída a uma hiperexcitação de receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA, AMPA e Cainato) levando a uma desregulação prolongada da homeostase do Ca^{2+} intracelular (Robinson et al., 1997). Este fato é corroborado pelo uso de antagonistas de receptores ionotrópicos que têm atividade neuroprotetora no processo isquêmico (Von Lubitz et al., 1993). Tem sido portanto sugerido que o aumento extracelular de glutamato/aspartato é um fator maior contribuindo para a morte neuronal observada seguindo episódios de isquemia cerebral (Graham et al., 1993).

Em nossos experimentos, detectamos níveis elevados de glutamato/aspartato nos hipocampos dos animais submetidos à isquemia que foram sacrificados após 24 horas de reperfusão quando comparados aos animais falso-operados. Entretanto, existe evidência de que não há aumento durante o período pós-isquêmico na atividade daqueles neurônios usando glutamato como neurotransmissor (Sims & Zaidan, 1995). Em um modelo *in vitro* (fatias cerebrais expostas à privação de oxigênio e glicose), foi detectado um aumento nos níveis de glutamato e aspartato até nos primeiros estágios da reperfusão, demonstrando que os níveis de glutamato/aspartato são tempo-dependente (De Alba et al., 1999). Foram também descritos aumentos nos níveis desses aminoácidos em um modelo de isquemia focal em ratos espontaneamente hipertensos, através de microdiálise. A utilização desta técnica serviu para monitorizar as concentrações de AAEs extracelulares no estriato isquêmico durante o curso da oclusão da OACM seguida de reperfusão. Elevações significantes imediatamente após 30 minutos de

OACM ocorreram e retornaram a níveis basais seguindo a reperfusão, mostrando de fato, uma correlação positiva entre a severidade do dano isquêmico (volume do infarto) e os níveis extracelulares totais tanto de glutamato como de aspartato durante a MCAO. A infusão do bloqueador de canal de Na⁺ voltagem-dependente tetrodotoxina (TTX) durante o período isquêmico resultou numa significativa atenuação das concentrações de AAEs, mostrando que, pelo menos em parte, os AAEs são liberados através de mecanismos Na⁺-dependente, (De Alba et al., 1999).

Um sítio alternativo de liberação de AAEs reside em células gliais e um dos mecanismos pelos quais o efluxo dos AAEs pode ocorrer é pela reversão dos processos de recaptção dependentes de Na⁺ (Szatkowski et al., 1994), o que explicaria a queda dos níveis desses AAEs após o uso do bloqueador de canal de Na⁺, permitindo assim que o processo de recaptção de glutamato aconteça sem essa interferência. Já foi previamente descrita que a sobrecarga de Na⁺ induzida pela isquemia é um evento precoce que precede a completa quebra da homeostase iônica (Xie et al., 1991) A aplicação de dihidrocainato (DHK), um inibidor seletivo do transportador 1 glial de glutamato (GLT-1), não alterou as concentrações dos AAEs sob condições basais, refletindo que esse tipo de transportador não é tonicamente ativo nessas condições ou que pequenos aumentos da concentração de AAEs induzidos pelo bloqueio do GLT-1 foram compensados por outros transportadores. Alternativamente, a infusão do DHK durante a isquemia reduziu os aumentos evocados pela OACM durante 60 min, indicando que, nesta situação, a liberação de AAEs é um processo dependente do transportador glial de glutamato.

Em resumo, esses dados indicam que o efluxo de AAEs induzido por isquemia focal transitória no core do infarto origina-se tanto de sítios gliais como neuronais (Dawson et al., 2000). Em outro estudo, os níveis extracelulares de AAEs foram também marcadamente aumentados após 20 min de isquemia induzida pela oclusão das artérias carótidas em ratos, com declínio durante a reperfusão. Neste caso, os autores utilizaram o l-lactato para reverter a excitotoxicidade dos AAEs, obtendo atenuação dos níveis de glutamato com o seu uso.

O lactato é produzido glicoliticamente pelos astrócitos e então exportado, captado pelos neurônios e convertido a piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase que é capaz de entrar diretamente no ciclo do ácido tricarboxílico, submetendo-se a metabolismo oxidativo com formação de ATP (Figuras 5 e 6). O l-lactato funcionaria como um sítio energético para células corticais cerebrais isquêmicas/reperfundidas e teria conseqüente ação cerebroprotetora (Cassady et al., 2001). Interessantemente, portanto, as persistentes elevações das concentrações dos AAEs mesmo após 24 horas de reperfusão obtidas nos nossos resultados diferem dos achados acima nos quais os níveis de AAEs rapidamente declinaram com o início da reperfusão. Este achado é possivelmente associado ao fato que os experimentos foram realizados com animais idosos e que o processo neurotóxico induzido pelo glutamato pode ser mais severo nesta população.

Outros trabalhos registraram diferenças relacionadas a idade no grau de fluxo sanguíneo cerebral (FSC) do *infratentorium* para o *supratentorium* durante oclusão carotídea em ratos, indicadas pela relação do FSC com FSCerebelar. O suprimento sanguíneo da circulação vertebro-

basilar (*infratentorium*) para o cérebro (*supratentorium*) não foi suficiente em ratos idosos após oclusão carotídea, presumivelmente pela presença de alterações escleróticas nestas artérias e dano metabólico mais severo foi relacionado a este fluxo sanguíneo colateral incompleto. Portanto, a idade é um importante fator para o prejuízo da reatividade vascular a estímulos físicos, químicos e neurais (He et al., 1997). Essa evidência poderia justificar, pelo menos em parte, os persistentes níveis elevados de glutamato/aspartato mesmo 24 horas pós-reperfusão.

Os nossos resultados mostraram que as concentrações de aspartato obtidas com o modelo de isquemia-reperfusão não foram alteradas pela administração do tenoxicam em ambas as doses de 2,5 e 10 mg/kg, provavelmente porque o processo inflamatório é mais expressivo na fase de perfusão, contribuindo para o dano secundário da lesão isquêmica e de acordo com os dados de Sims & Zaidan, 1995, a liberação de glutamato e aspartato é predominante nos estágios iniciais da isquemia, quando a falência energética é mais pronunciada, associada à acidose intracelular e acúmulo de Ca^{2+} .

Em nosso trabalho, os níveis de ATP mensurados após 45 min de isquemia global transitória seguida de uma hora de perfusão foram expressivamente menores que os níveis de ATP medidos com 24 horas de perfusão, achado que está de acordo com os dados de estudos prévios que evidenciam uma queda dos níveis de ATP durante a fase de isquemia e logo no início da perfusão. Nos primeiros 2 min de isquemia, as concentrações de ATP são reduzidas em mais de 80% (Katsura et al., 1993) e o retorno para valores pré-isquêmicos varia ainda de acordo com o tempo de exposição à

isquemia seguida de reperfusão, sendo mais lenta a recuperação desses níveis quanto maior o período isquêmico (Fukuchi et al., 1998; Katayama et al., 1998). A restituição do fluxo sanguíneo cerebral resulta, portanto, na rápida reversão de muitas das alterações metabólicas produzidas durante a isquemia, com o ATP atingindo aproximadamente 60% a 80% do valor normal (Sims & Zaidan, 1995). O nosso estudo evidencia, portanto, o aumento crescente dos níveis de ATP à medida que o tempo de reperfusão aumenta, refletindo a gradual normalização do fluxo sanguíneo cerebral e dos metabólitos já demonstrada anteriormente (Cardell et al., 1989; Katayama et al., 1998).

É interessante notar que com o uso de tenoxicam em ambas as doses nos animais sujeitos à isquemia/reperfusão, os níveis de ATP se mantiveram próximos aos níveis do controle, mas com uma diminuição discreta e não significativa em relação ao grupo isquemiado não tratado. Essa atenuação dos níveis de ATP pode ser consequência do desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Figura 5) causado por muitos AINEs com inibição do “turnover” de ATP (Mahmud et al., 1996; Krause et al., 2003). Este efeito pode ser considerado indesejado, apesar de discreto e não significativo no presente estudo.

As determinações enzimáticas dos níveis de lactato realizadas em nossos experimentos apresentam elevações discretas no grupo submetido à isquemia/reperfusão em relação ao grupo controle, tanto com 1 hora como com 24 horas de reperfusão e, se compararmos os grupos de 1 hora com os de 24 horas de reperfusão, os níveis de lactato foram ainda mais pronunciados nos grupos de 24 horas de reperfusão. Considerando as evidências nas quais o processo isquêmico acumula lactato (Cheng et al., 2000) como resultado do

metabolismo anaeróbico da glicose e o lactato retorna para níveis pré-isquêmicos com a instalação da reperfusão (Sims & Zaidan, 1995; Cardell et al., 1989), nossos dados não estariam de acordo com essas evidências, já que, com maior tempo de reperfusão, os níveis de lactato aumentaram.

Entretanto, a importância dessa divergência se reflete no fato que nossos experimentos foram realizados com animais idosos, cujo comportamento às mudanças de fluxo sanguíneo cerebral e de metabolismo energético se expressa com diferenças importantes em relação a uma população de animais mais jovens. Em um estudo avaliando o fluxo sanguíneo cerebral colateral e o metabolismo cerebral na isquemia relacionada à idade, foi documentado menor fluxo sanguíneo colateral da circulação vertebro-basilar para a circulação carotídea e maior dano metabólico em animais idosos submetidos à isquemia por oclusão carotídea bilateral do que em animais adultos, com os níveis lactato mais elevados mensurados imediatamente após o término de 60 min de isquemia.

Este fato é explicado pelas alterações escleróticas das artérias do sistema vértebro-basilar nesses animais idosos associadas a uma reatividade vascular a estímulos neurais, químicos e físicos prejudicada, condições que propiciam uma maior suscetibilidade às lesões isquêmicas (He et al., 1997). Outra condição que contribui para o maior dano metabólico, com os níveis de lactato encontrados mais elevados após 24 horas de reperfusão do que com 1 hora de reperfusão nos animais idosos estudados no nosso trabalho é o fenômeno de “no-reflow”, caracterizado por uma reperfusão incompleta e hipoperfusão pós-isquêmica, associado a uma paralisia vaso-motora e a alterações de microvasculatura decorrentes de adesão e agregação de

neutrófilos, liberação de moléculas de adesão e citocinas e obstrução vascular por neutrófilos ativados (Figura 9), (Iadecola, 1999). O tenoxicam na dose de 2,5 mg/kg reduziu os níveis de lactato no grupo de 24 horas de reperfusão em relação ao grupo isquemiado não-tratado, talvez por alguma interferência neste fenômeno de “no-reflow”, diminuindo a agregação de neutrófilos ativados, através de sua ação inibitória sobre a COX, permitindo um melhor fluxo pós-isquêmico, o que seria um efeito benéfico do uso deste AINE na fase de reperfusão. Em relação ao grupo com 1 hora de reperfusão, ambas as doses de tenoxicam não alteraram os níveis de lactato, fato que pode ser explicado pela ausência de um processo inflamatório significativo ainda neste período inicial de reperfusão pós-isquêmica, já que a participação de neutrófilos e o pico de expressão de COX ocorrem principalmente com 12-24 horas após a isquemia (Del Zoppo et al., 2000).

Os níveis de piruvato em nosso estudo se apresentaram elevados no grupo submetido à isquemia em relação ao grupo controle nos animais com isquemia-reperfusão 1 hora, mas praticamente não se alteraram nos animais submetidos à isquemia-reperfusão 24 horas. Portanto, entre os grupos de reperfusão 1 hora e 24 horas, houve diferença significativa nos valores de piruvato, sendo esses níveis bem mais elevados após reperfusão por 1 hora seguindo o período isquêmico. Estes achados evidenciam uma menor atividade da piruvato-desidrogenase, enzima responsável pela degradação de piruvato a acetil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico associado à fosforilação oxidativa (Figura 5), no início do restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral após episódio de isquemia, resultando numa maior quantidade detectável de piruvato decorrente de sua menor degradação.

Esta evidência está em acordo com dados que mostram a atividade acentuada desta enzima durante o período isquêmico e diminuição importante da sua atividade no início da reperfusão, com recuperação subsequente da sua ação (Fukuchi et al., 1998; Katayama et al., 1998; Bogaert et al., 1994) e níveis diminuídos de piruvato (Cheng et al., 2000). Por esse motivo, os níveis de piruvato que estavam aumentados após reperfusão de 1 hora praticamente se normalizam após 24 horas de reperfusão. O efeito do tenoxicam nas doses de 2,5 e 10 mg/kg resultou em diminuição desses valores nos animais sujeitos à isquemia-reperfusão de 1 hora mas não alterou os valores no grupo reperfundido por 24 horas. O motivo dessa ação do tenoxicam pode ser talvez pelo mesmo efeito deste AINE no desacoplamento da fosforilação oxidativa citada acima, com conseqüente diminuição do ATP.

O ATP age inibindo a enzima PDH, logo, evitando a degradação do piruvato. Com a ação do tenoxicam, este efeito inibitório na PDH não ocorre, o piruvato é degradado e seus níveis diminuídos. Entretanto, foram demonstradas evidências de que a atividade da enzima PDH mitocondrial é importante na recuperação de fosfatos de alta energia e no restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral regional em gerbils submetidos à isquemia por OCB transitória (Fukuchi et al., 1998) Desse modo, o tenoxicam poderia ter algum efeito benéfico positivo na regulação da ação desta enzima para a restauração das fontes energéticas no período de reperfusão.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta investigação nos permite concluir que:

- Um aumento dos níveis de mieloperoxidase após isquemia-reperfusão foi observado nos animais isquemiados e este efeito foi revertido com ambas as doses de tenoxicam, possivelmente dado às propriedades anti-inflamatórias da droga.
- Um aumento dos níveis de nitrito/nitrato foi induzido pela isquemia, com uma discreta tendência para reversão desses valores com o uso de tenoxicam em ambas as doses
- Os níveis de dopamina aumentaram de forma significativa após a isquemia e foram atenuados com o uso de tenoxicam em ambas as doses, revertendo um dos fatores prejudiciais no dano isquêmico. Os níveis de 5-HIAA foram reduzidos com a isquemia. As demais monoaminas não apresentaram alterações nem com a isquemia nem com o uso do tenoxicam.
- Os níveis de glutamato/aspartato apresentaram elevações mesmo após 24 horas de isquemia, o que sugere um dano isquêmico mais expressivo nos animais idosos.
- Os níveis de ATP apresentaram relativa queda no grupo de perfusão de 1 hora em relação ao grupo com perfusão de 24 horas, o que reflete uma menor taxa metabólica quanto mais próximo do período isquêmico. Os

valores tiveram uma discreta queda com o uso do tenoxicam talvez por sua ação no desacoplamento da cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial.

- Os níveis de lactato não apresentaram variações significativas dos seus valores, fato explicado pela reperfusão, quando os valores se normalizam. Os valores não foram alterados pelo tenoxicam.

- Os níveis de piruvato apresentaram uma queda no grupo de reperfusão de 24 horas em relação ao de 1 hora, sugerindo uma recuperação na função da enzima piruvato desidrogenase e esses valores foram alterados pelo uso de tenoxicam na dose 2,5 mg/kg, sugerindo um possível papel adjuvante na restauração do metabolismo cerebral.

- A alteração histológica peculiar da isquemia foi evidenciada em nosso estudo e com tendência para reversão dessas alterações com o uso do tenoxicam.

- O efeito do tenoxicam é decorrente da sua ação inibitória sobre a ciclooxigenase e os mediadores inflamatórios envolvidos na cascata inflamatória associada ao dano secundário provocado pelo processo reperfusão pós-isquemia.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

AKOPOV, S.E., SIMONIAN, N.A., GRIGORIAN, G.S. Dynamics of polymorphonuclear leukocytes accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. **Stroke**, v. 27, p. 1739-1743, 1996.

ASHE, P.C. & BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 199-214, 2003.

BECKER, K., KINDRICK, D., RELTON, J., HARLAN, J., WINN, R. Antibody to the α -4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 32, p. 206-211, 2001.

BELAYEV, L., ZHAO, W., BUSTO, R., GINSBERG, M.D. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: I. Three-dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 17(12), p. 1266-1280, 1997.

BLAKE, G.J. & RIDKER, P.M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. **Circulation Research**, v. 89, p. 763-771, 2001.

BOGAERT, Y.E., ROSENTHAL, R.E., FISKUM, G. Postischemic inhibition of cerebral cortex pyruvate dehydrogenase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16(6), p. 811-820, 1994.

BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHIRSTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of Neutrophil content with an enzyme marker, **J Invest Dermatol**; v.78: 206-9, 1982.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigate Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BROOKS, P.M. & DAY, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs—differences and similarities. **N. Engl. J. Med.**, v., 324, p. 1716-1725, 1991.

CAMPANELLA, M., SCIORATI, C., TAROZZO, G., BELTRAMO, M. Flow cytometric analysis of inflammation cells in ischemic rat brain. **Stroke**, v. 33, p. 586-592, 2002.

CAPLAN, L.R. & CHUNG, C-S. Neurovascular disorders. In Christopher G. Goetz & Eric J. Pappert (Eds), 1st ed, **Textbook of clinical neurology**, W.B. Saunders company, p. 907-932, 1999.

CAPLAN, L.R. Charles Foix-the first modern stroke neurologist. **Stroke**, v. 21, p. 348-356, 1990.

CARDELL, M., KOIDE, T., WIELOCH, T. Pyruvate dehydrogenase activity in the rat cerebral cortex following cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 9, p. 350-357, 1989.

CASSADY, C., PHILLIS, J.W., O'REGAN, M.H. Further studies on the effects of topical lactate on amino acid efflux from the ischemic rat cortex. **Brain Res.**, v. 901, p. 30-37, 2001.

CASTELLANOS, M., CASTILLO, J., GARCIA, M.M., LEINE, R., SERENE, J., CHAMORRO, A., DÁVALOS, A. Inflammation-mediated damage in processing lacunar infarctions. **Stroke**, v. 33, p. 982-987, 2002.

CHENG, F-C., YANG, L-L., YANG, D-Y., TSAI, T-H., LEE, C-W., CHEN, S-H. Monitoring of extracellular pyruvate, lactate, and ascorbic acid during cerebral ischemia: a microdialysis study in awake gerbils. **J Chromatography A**, v. 870, p. 389-394, 2000.

CLIVE, D.M. & STOFF, J.S. Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 310, p. 563-572, 1984.

COLASANTI, M. & SUZUKI, H. The dual personality of NO. **TiPS**, v. 21, p. 249-252, 2000.

CROWL, R.M., STOLLER, T.J., CONROY, R.R., STONER, C.R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 2647-2651, 1991.

CUZZOCREA, S., MCDONALD, M.C., MAZZON, E., SIRIWARDENA, D., CONSTANTINO, G., FULIA, F., CUCCINOTA, G., GITTO, E., CORDANO, S., BARBERI, I., DE SARRO, A., CAPUTI, A.P., THIEMERMANN, C. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. **Brain Research**, v. 875, p. 96-106, 2000.

DAWSON DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. **Cerebrovasc Brain Metab Rev.**, v. 6, p.299–324, 1994.

DAWSON, L.A., DJALI, S., GONZALES, C., VINAGRA, M.A., ZALESKA, M.M. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. **Brain Research Bulletin**, v. 53(6), p. 767-776, 2000.

DE ALBA, J., CÁRDENAS, A., MORO, M.A., LEZA, J.C., LORENZO, P., LIZASOAIN, I. Use of brain slices in the study of pathogenic role of inducible nitric oxide synthase in central ischemia-reperfusion. **General Pharmacol**, v. 32, p. 577-581,1999.

DEL ZOPPO, G.J., GINIS, I., HALLENBECK, J.M., IADECOLA, C., WANG, X., FEUERSTEIN, GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia [review]. **Brain Pathol**, v. 10, p. 95-112, 2000a.

DEL ZOPPO, G.J., HALLENBECK, J.M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thrombosis Res**, v. 98, V73-V81, 2000b.

EGGERS, K.A., JENKIS, B.J., POWER, I. Effects of oral and i.v. tenoxicam in postoperative pain after total knee replacement. **Br. J. Anesth.**, v. 83(6), p. 876-881, 1999.

EMSLEY, H.C.A., TYRRELL, P.J. Inflammation and infection in clinical stroke [review]. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, p. 1399-1419, 2002.

Feuerstein G, Wang X, Barone FC. Cytokines in brain ischemia--the role of TNF alpha. *Cell Mol Neurobiol*. 1998 Dec;18(6):695-701.

FOSTER, C. CLARK, H.B., ROSS, M.E., IADECOLA, C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. **Acta Neuropathol. (Berl)**, v. 97, p. 215-220, 1999.

FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1365-1375, 2003.

FUKUCHI, T., KATAYAMA, Y., KAMIYA, T., MCKEE, ^a, KASHIWAGI, F., TERASHI, A. The effect of duration of cerebral ischemia on pyruvate dehydrogenase activity, energy metabolites, and blood flow during reperfusion in gerbil brain. **Brain Res.**, v. 792, p. 59-65, 1998.

GARCIA, J.H., LIU, K.F., YOSHIDA, Y., LIAN, J., CHEN, S., DEL ZOPPO, G.J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rats). **Am J Pathol**, v.144(1), p. 188-199, 1994.

GINSBERG M D. Animal models of global and focal cerebral ischemia. In: Welsh KMA, Caplan LC, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, eds. **Primer on Cerebrovascular Disease**. San Diego: Academic Press, p.124-126, 1997.

GINSBERG, M.D. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. **Stroke**, v. 34, p. 214-223, 2003.

GOMEZ-NIÑO, A., ALMARAZ, L., GONZÁLEZ, C. Potentiation by cyclooxygenase inhibitors of the release of catecholamines from the rabbit carotid body and its reversal by prostaglandin E2. **Neuroscience Letters**, v. 140, p. 1-4, 1992.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR.. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, p.126, 1982.

GROSS, C.E., BEDNAR, M.M., SPORN, M.B. Transforming growth factor- β 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. **Stroke**, v. 24, p. 558-562, 1993.

HE, Z., IBAYASHI, S., SUGIMORI, H., FUJII, K., SADOSHIMA, S., FUJISHIMA, M. Age-related ischemia in the brain following bilateral carotid artery occlusion – collateral blood flow and brain metabolism. **Neurochem Res**, v. 22(1), p. 37-42, 1997.

HOHORST HJ, KREUTZ FH, BUECHER T. [On the metabolite content and the metabolite concentration in the liver of the rat.] **Biochem Z.**, v.332, p.18-46, 1959.

HOHORST HJ. D-Glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. Determination with glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase. In: ergmeyer HU, editor. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press; 1963. p.134-8.

HUANG, Y-C., TSAI, S-K., HUANG, C-H., WANG, M-H., LIN, P-L., CHAN, L-K., LIN, L-J., SUN, W-Z. Intravenous tenoxicam reduces uterine cramps after cesarean delivery. **Can. J. Anesth.**, v. 49(4), p. 384-387, 2002.

HWANG, I.S., SHIN, C.Y., HUH, Y., RYU, J.H. Hwangryun-Hae-Dok-Tang (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract and its constituents reduce ischemia-reperfusion brain injury and neutrophil infiltration in rats. **Life Sci**, v. 71, p. 2105-2117, 2002.

IADECOLA, C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In Wolfgang Walz (ed), **Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology**, New Jersey : Humana Press, p. 3-32, 1999.

IADECOLA, C., ZHANG, F., CASEY, R., CLARK, H.B., ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 27(8), p. 1373-1380, 1996.

IADECOLA, C., ZHANG, F., XU, X., CASEY, R., ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 15, p. 378-384, 1995.

INSTEL, P. Chemical mediators of inflammation. In **Cotran: Robbins pathologic basis of disease**, 6th ed., W.B.Saunders company, 1999.

KAMIJO, R., HARADA, H., MATSUYAMA, T., BOSLAND, M., GERECITANO, J., SHAPIRO, D., LE, J., KOH, S.I., KIMURA, T., GREEN, S.J., MAK, T.W., TANIGUCHI, T., VILCEK, J. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, v. 263, p. 1612-1615, 1994.

KANEMOTO, Y., NAKASE, H., AKITA, N., NAKAKI, T. Effects of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on reperfusion injury induced by late reperfusion in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Neurosurgery**, v. 51, p. 1034-1042, 2002.

KATAYAMA, Y., FUKUCHI, T., KEE, A.M., TERASHI, A. Effect of hyperglycemia on pyruvate dehydrogenase activity and energy metabolites during ischemia and reperfusion in gerbil brain. **Brain Res.**, v. 788, p. 302-304, 1998.

KATSURA, K. RODRIGUEZ DE TURCO, E.B., FOLBERGROVÁ, J., BAZAN, N.G., SIESJÖ, B.K. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 1677-1684, 1993.

KHAYYAM, N., THAVENDIRANATHAN, P., CARMICHAEL, F.J., KUS, B., JAY, V., BURNHAM, W.M. Neuroprotective effects of acetylsalicylic acid in an animal model of focal brain ischemia. **Neuroreport**, v. 10, p. 371-374, 1999.

KOLESNICK, R., GOLDE, W. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. **Cell**, v. 77, p. 325-328, 1994.

KRISTIÁN, T. & SIESJÖ, B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v. 29, p. 705-718, 1998.

LIEBERMAN, A.P., PITHA, P.M., SHIN, H.S., SHIN, M.L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p. 6348-6352, 1989.

LIN, B., GISNBERG, M.D., BUSTO, R., LI, L. Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 278, p. 1-4, 2000.

LINDSBERG, P.J., ROINE, R.O., TATLISUMAK, T., SAIRANEN, T., KASTE, M. Stroke: the future of stroke treatment. **Neurol Clinics**, v. 18(2), p. 495-510, 2000.

LIU, T. MCDONELL, P.C., YOUNG, P.R., WHITE, R.F., SIREN, A.L., HALLENBECK, J.M., BARONE, F.C., FEUERSTEIN, G.R. Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. **Stroke**, v. 24, p. 1746-1751, 1993.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, p. 267-282, 2003.

LOVE, S., BARBER, R., SRINIVASAN, A., WILCOCK, G.K. Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischemia in man. **Neuroreport**, v. 11, p. 2495-2499, 2000.

MAGISTRETTI, P. Brain energy metabolism. In Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (Eds) **Fundamental Neuroscience**. San Diego: Academic Press, p.389-413, 1999.

MARNETT, L.J. & KALGUTKAR, A.S. Cyclooxygenase-2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. **TIPS**, v. 20, p. 465-469, 1999.

MATSUO, Y., KIHARA, T., IKEDA, M., NINOMIYA, M., ONODERA, H., KOGURE, K. Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. **Brain Res**, v. 709, p. 296-302, 1996.

MEADE R, NEDDERMANN KM, GREENFIELD RS, BRASLAWSKY G, BURSUKER I. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plays a role in the functional activity of mast cells. **J Leukoc Biol**, v.54(6), p.523-7, 1993.

MERRY, A.F., SWINBURN, P.F., MIDDLETON, N.G., EDWARDS, J.L., COLDER, M.V. Tenoxicam and paracetamol-codeine combination after oral surgery: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Br. J. Anesth.** , v. 81, p. 875-880, 1998.

MORIKAWA, E., ROSENBLATT, S., MOSKOWITZ, M.A. L-arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 905-907, 1992.

MORLEY, P., HORGAN, M.J., HAKIM, A.M. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection. **Brain Pathol.**, v. 4, p. 37-47, 1994.

NAGAYAMA, T. The uropod common inhibitory motor neurone in the terminal abdominal ganglion of the crayfish. **J. Exp. Zool**, v.283, p.541 -547, 1999.

NAKAYAMA, M., UCHIMURA, K., ZHU, R.L., NAGAYAMA, T., ROSE, M.E., STELLER, R.A, ISAKSON, P.C., CHEN, J., GRAHAM, S.H. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 10954-10959, 1998.

NISHIGAYA, K., YOSHIDA, Y., SASUGA, M., NUKUI, H., OONEDA, G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. **Stroke**, v. 22, p. 635-642, 1991.

NOGAWA S, FORSTER C, ZHANG F, NAGAYAMA M, ROSS ME, IADECOLA C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.95(18), p.10966-71, 1998

NOGAWA, S., ZHANG, F., ROSS, M.E., IADECOLA, C. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 2746-2755, 1997.

O'HANLON, D.M., THARNBIPILLAI, T., COLBERT, S.T., KEANE, P.W., GIVEN, H. F. Timing of pre-emptive tenoxicam is important for postoperative analgesia. **Can. J. Anesth.**, v. , p. 162-166, 2000.

OSTROWSKI, R.P., PIOTROWSKI, P., PANKOWSKA, T., SMIALEK, M. Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q10 in ET-1 experimental ischemia in the rat. **Folia Neuropathol.** , v. 36, p. 185-188, 1998.

PANTONI, L., SARTI, C., INZITORI, D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia experimental bases and therapeutic perspectives. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.18, p. 503-513, 1998.

PUSINELLI, W.A., BRIERLEY, J.B., PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann. Neurol.**, v. 11, p. 491-498, 1982.

RELTON, J.K., SLOAN, K.E., FREW, E.M., WHALLEY, E.T., ADAMS, S.P., LOBB, R.R. Inhibition of α -4 integrin protects against transient focal cerebral ischemia in normotensive and hypertensive rats. **Stroke**, v. 32, p. 199-205, 2001.

ROMSI P, HEIKKINEN J, BIANCARI F, POKELA M, RIMPILAINEN J, VAINIONPAA V, HIRVONEN J, JANTTI V, KIVILUOMA K, ANTTILA V, JUVONEN T. Prolonged mild hypothermia after experimental hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. **J Thorac Cardiovasc Surg.**, v.123(4), p.:724-34, 2002.

ROSE, D.M., WINSTON, B.W., CHAN, E.D., RICHES, D.W.H., HENSON, P.M. Interferon- γ and transforming growth factor- β modulating the activation of mitogen-activated protein kinases and tumor necrosis factor- α production induced by Fcy-receptor stimulation in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 238, p. 256-260, 1997.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease [review]. **New Engl J Med**, v. 340(2), p. 115-126, 1999.

SAIRANEN, T., CARPEN, O., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L., PAETAU, A., TURPEINEN, U., KASTE, M. Evolution of cerebral tumor necrosis factor-[alpha] production during human ischemic stroke. **Stroke**, v. 32, p. 1750-1757, 2001.

SAIRANEN, T., RISTIMAKI, A., KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L. Cyclooxygenase-2 is induced globally in infarcted human brain. **Ann Neurol**, v. 43, p. 738-747, 1998.

SHERMAN, D. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the enlimomab acute stroke trial. **Neurology**, v. 57, p.8, 2001.

SIESJÖ, B.K., SIESJÖ, P. Mechanisms of secondary brain injury. **E J Anesthesiology**, v. 13(3), p. 247-268, 1996.

SIMS, N.R, ZAIDAN, E. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischemia [review]. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 27(6), p. 531-550, 1995.

STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

SUFKA, K.J., HOGANSON, D.A. Effects of calcitonin on CNS monoamines following carageenan-induced inflammation in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, p. 507-511, 1993.

SWANSON, R.A., FARRELL, K., STEIN, B.A. Astrocytes energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: a mechanism of glial death in the penumbra. **Glia**, v. 21, p. 142-153, 1997.

TAKAMI, S., MINAMI, M., KATAYAMA, T., NAGATA, I., NAMURA, S., SATOH, M. TAK-779, a nonpeptide CC chemokine receptor antagonist, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, p. 780-784, 2002.

WEAVER, M., LESHLEY, K., SANDS, H., GRITMAN, K.R., LEGOS, J.L., TUMA, R.F. LEX032, a novel recombinant serpin, protects the brain after transient focal ischemia. **Microvasc Res**, v. 63, p. 327-334, 2002.

WYLLIE, A. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: **Cell Death in Biology and Pathology**. (Bowen, I. and Lockshin R., eds.). Chapman and Hall, London, England, p. 1-34, 1981.

XIE X, BARRET J. Membrane releasing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. **J. Neurosci.** V.11, p.3257-3267, 1991.

YAMADA, M., NIKI, H., YAMASHITA, M., MUE, S., OHUCHI, K. Prostaglandin E2 production dependent upon cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 and its contradictory modulation by auranofin in rat peritoneal macrophages. **J.P.E.T.**, v. 281, p. 1005-1012, 1997.

YAMASAKI, Y., MATSUO, Y., ZAGORSKI, J., MATSUURA, M., ONODERA, H., ITOYAMA, Y., KOGURE, K. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. **Brain Res**, v. 759, p. 103-111, 1997.

YAMASAKI, Y., MATSUURA, N., SHOZUHARA, H., ONODERA, H., ITOYAMA, Y., KOGURE, K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in the rats. **Stroke**, v. 26, p. 676-681, 1995.

ZHANG, F., IADECOLA, C. Reduction of focal cerebral ischemic damage by delayed treatment with nitric oxide donors. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 14, p. 574-580, 1994.

ZHANG, F., XU, X., IADECOLA, C. Time-dependence of the effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 15, p. 595-601, 1995.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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