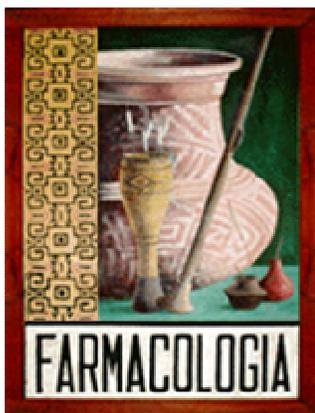




**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

# **AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA PROBENECIDA NA LESÃO NEURAL EXCITOTÓXICA E ISQUÊMICA**

**Marcela Jardim Gomes Elias**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Orientador: Newton Gonçalves de Castro

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

# **AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA PROBENECIDA NA LESÃO NEURAL EXCITOTÓXICA E ISQUÊMICA**

**Marcela Jardim Gomes Elias**

Orientador: Newton Gonçalves de Castro

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Examinada por:

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo  
Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Profa. Dra. Patrícia Franca Gardino  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Dr. Ricardo Augusto de Mello Reis  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Profa. Dra. Ana Luísa Palhares de Miranda  
Faculdade de Farmácia, UFRJ

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2010

Elias, Marcela Jardim Gomes.

Avaliação do efeito neuroprotetor da probenecida na lesão neural excitotóxica e isquêmica/ Marcela Jardim Gomes Elias. – Rio de Janeiro: UFRJ / ICB, 2010.

viii, 89f.: il., 31 cm.

Orientador: Dr. Newton Gonçalves de Castro

Dissertação (mestrado) – UFRJ / ICB / Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 75-89.

1. Probenecida 2. Isquemia cerebral. 3. Neuroproteção. 4. Excitotoxicidade. I. Castro, Newton Gonçalves de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Terapêutica Experimental. III. Título.

## RESUMO

### Avaliação do Efeito Neuroprotetor da Probenecida na Lesão Neural Excitotóxica e Isquêmica

Marcela Jardim Gomes Elias

Orientador: Newton Gonçalves de Castro

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

O acidente vascular encefálico (AVE) é a segunda maior causa de morte no mundo. Após um acidente isquêmico, a liberação excessiva de glutamato desencadeia uma série de eventos intracelulares, que podem contribuir para a morte ou para a sobrevivência neuronal. Muitos mediadores envolvidos neste processo estão sob investigação em estudos que visam neuroproteção, a fim de diminuir a morte celular na zona de penumbra, onde ocorre lesão tardia. Probenecida, um bloqueador do transporte de ânions orgânicos, inibe o transporte de várias substâncias endógenas, incluindo algumas que estão envolvidas nos eventos decorrentes do insulto isquêmico. A probenecida já foi testada como adjuvante de substâncias neuroativas, como ácido quinurênico, porém pouco se sabe sobre seu efeito direto no sistema nervoso central. Nosso objetivo foi investigar o papel terapêutico da probenecida, *in vitro* e *in vivo*, como um fármaco neuroprotetor na isquemia cerebral e em doenças neurodegenerativas. A probenecida apresentou efeito neuroprotetor dependente de concentração *in vitro*, reduzindo o dano induzido por adição de glutamato em cultura mista de células corticais, com  $CI_{50}$  de 0,35 mM quando adicionada antes, durante e após insulto, e de 0,41 mM quando adicionada apenas após o insulto. Essa neuroproteção foi medida através da redução da liberação da enzima LDH. *In vivo* ela foi capaz de diminuir em 32% o volume do infarto causado pela eletrocauterização da artéria cerebral média em camundongos, quando administrada após indução da lesão. Estes resultados positivos podem justificar estudos futuros da aplicação terapêutica da probenecida em pacientes de AVE.

Palavras-chave: probenecida, excitotoxicidade, acidente vascular, isquemia cerebral, neuroproteção.

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2010

## **ABSTRACT**

### Evaluation of the Neuroprotective Effect of Probenecid in Excitotoxic and Ischemic Neural Lesion

Marcela Jardim Gomes Elias

Orientador: Newton Gonçalves de Castro

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

Stroke is the second leading cause of death worldwide. After an ischemic stroke, excessive release of glutamate triggers a series of intracellular events, which may contribute to neuronal death or survival. Many mediators involved in this process are under investigation in neuroprotection studies, in order to reduce cell death in the penumbra zone, where there is a delayed lesion. Probenecid, a blocker of organic anion transporters used in the treatment of gout, is able to inhibit the transport of various endogenous substances, including some that are involved in the events resulting from the ischemic insult. Probenecid has been tested as an adjunct to neuroactive substances, such as kynurenic acid, but little is known about its direct effect on the central nervous system. Our goal was to investigate the therapeutic role of probenecid *in vitro* and *in vivo* as a neuroprotective drug in cerebral ischemia and neurodegenerative diseases. Probenecid showed a concentration-dependent neuroprotective effect *in vitro*, reducing damage induced by the addition of glutamate in mixed cortical cell cultures, presenting an IC<sub>50</sub> of 0.35 mM when added before, during and after insult, and 0.41 mM when added only after insult. The neuroprotection was measured by the decrease of LDH's release. *In vivo*, it was able to reduce by 32% the volume of infarcts caused by the electrocauterization of the middle cerebral artery in mice, when given after induction of injury. These positive results may justify future studies of the therapeutic application of probenecid in stroke patients.

Keywords: probenecid, excitotoxicity, stroke, cerebral ischemia, neuroprotection.

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2010

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Epidemiologia do AVE .....                                      | 2         |
| Fatores de risco.....   | 4         |
| 1.2. Fisiopatologia do AVE.....                                     | 5         |
| Núcleo isquêmico e zona de penumbra.....                            | 7         |
| 1.2.1. Privação de Oxigênio e Glicose Associada ao AVE.....         | 9         |
| 1.2.2. Glutamato e Seus Receptores .....                            | 10        |
| Excitotoxicidade .....  | 12        |
| 1.2.3. O Receptor NMDA e a Excitotoxicidade.....                    | 15        |
| Antagonistas NMDA Como Alvos de Neuroproteção .....                 | 18        |
| 1.3. O Sítio de Ligação da Glicina Como Alvo de Neuroproteção ..... | 20        |
| 1.3.1. Via da Quinurenina.....                                      | 21        |
| Ácido quinurênico como alvo de neuroproteção .....                  | 22        |
| 1.4. Probenecida.....   | 24        |
| Efeitos adversos .....  | 25        |
| 1.4.1. Ações da probenecida.....                                    | 26        |
| Nos Transportadores da Família ABC .....                            | 26        |
| Em Outros Alvos.....  | 28        |
| No Transporte de Nucleotídeos Cíclicos .....                        | 30        |
| No SNC .....  | 31        |
| 1.5. Busca Por Fármacos Neuroprotetores.....                        | 35        |
| <b>2. Objetivos .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3. Material e Métodos .....</b>                                  | <b>40</b> |
| 3.1. Animais .....  | 40        |
| 3.2. Ensaio de Dano Induzido por Glutamato .....                    | 40        |
| 3.2.1. Cultura de células corticais.....                            | 40        |
| 3.2.2. Dano induzido pelo glutamato (DIG) .....                     | 42        |
| 3.2.3. Dosagem da enzima LDH .....                                  | 44        |
| 3.3. Oclusão Permanente da Artéria Cerebral Média .....             | 47        |
| 3.3.1. Procedimento cirúrgico.....                                  | 48        |
| 3.3.2. Pós-operatório.....  | 49        |
| 3.3.3. Tratamentos .....  | 50        |
| 3.3.4. Corte do cérebro e coloração pelo TTC .....                  | 51        |
| 3.4. Análise Estatística.....                                       | 53        |
| <b>4. Resultados .....</b>  | <b>54</b> |
| 4.1. Ensaio de Neuroproteção in vitro .....                         | 54        |
| 4.1.1 Avaliação da Citotoxicidade da Probenecida .....              | 57        |
| 4.2 Ensaio de Neuroproteção in vivo .....                           | 58        |
| <b>5. Discussão .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>6. Conclusão e perspectivas .....</b>                            | <b>74</b> |
| <b>7. Referências Bibliográficas .....</b>                          | <b>75</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| ABC           | - <i>ATP-binding cassette</i>   |
| ACM           | - artéria cerebral média  |
| AMPA          | - ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico               |
| AMPc          | - monofosfato 3',5'-cíclico de adenosina                                |
| AQ            | - ácido quinurênico   |
| AU            | - ácido úrico   |
| AVE           | - acidente vascular encefálico  |
| CaMKII        | - proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina                  |
| DA            | - depressão alastrante  |
| DIG           | - dano induzido por glutamato   |
| DNase         | - desoxirribonucleotidase   |
| FK            | - forskolina  |
| GABA          | - ácido gama-amino butírico   |
| GMPc          | - monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina                                |
| HEPES         | - ácido <i>N</i> -2-hidroxietil-piperazina <i>N</i> '-2 etanossulfônico |
| IBMX          | - isobutil 1-metil-xantina  |
| IDO           | - indolamina 2,3-dioxigenase  |
| IFN- $\gamma$ | - interferon- $\gamma$  |
| KATs          | - quinurenina aminotransferases   |
| LDH           | - lactato desidrogenase   |
| LQ            | - L-quinurenina   |
| MEM           | - meio essencial mínimo   |
| mGluR         | - receptores metabotrópicos de glutamato                                |
| MRP           | - proteína de resistência a múltiplos fármacos                          |
| NBD           | - sítio de ligação ao nucleotídeo                                       |
| NMDA          | - <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato                                  |
| OACM          | - oclusão permanente da artéria cerebral média                          |
| OAT           | - transportadores de ânions orgânicos                                   |
| PKA           | - proteína quinase A  |
| PKC           | - proteína quinase C  |

|       |   |
|-------|---|
| rt-PA | - ativador de plasminogênio tecidual recombinante |
| SAF   | - substrato + alúmen férrico                      |
| SNAP  | - <i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetilpenicilamina |
| SNC   | - sistema nervoso central                         |
| TOD   | - triptofano 2,3-dioxigenase                      |
| TTC   | - cloreto de 3-trifenil tetrazólio                |
| TTX   | - tetrodotoxina                                   |

# 1. INTRODUÇÃO

O cérebro humano é um órgão dispendioso em termos de uso de energia. Apesar de contar como 2% do peso corporal, ele requer cerca de 20% da taxa metabólica de um indivíduo em repouso para manter suas funções (Dugan e Kim-Ham, 2006). Devido a esse status metabólico especial, o cérebro é particularmente vulnerável a injúrias isquêmicas, quando comparado a outros órgãos.

O dano isquêmico cerebral ocorre em diversos quadros clínicos. O mais comum deles é o infarto – interrupção ou redução focal do suprimento sanguíneo em uma região do cérebro. O infarto agudo, com alterações neurológicas de início súbito, é também conhecido como acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o AVE como a manifestação clínica de rápido início de um déficit do suprimento sanguíneo no encéfalo, podendo ser focal ou global, durando mais de 24 h (a não ser que seja interrompida por cirurgia ou por óbito), sem uma causa aparente que não seja vascular. Os AVEs são na maioria isquêmicos e focais, mas podem ser hemorrágicos e globais. No AVE isquêmico não há ruptura na parede da artéria e no hemorrágico, sim. O AVE hemorrágico, porém, é responsável por apenas 10-15% dos casos. Este último geralmente está associado à hipertensão e à formação de aneurismas.

O AVE isquêmico ocorre quando uma artéria é ocluída por um êmbolo, que geralmente é um coágulo sanguíneo ou resíduo de uma placa de ateroma formada em uma artéria maior, ou por um trombo formado na própria artéria afetada (Dugan e Kim-Ham, 2006; Dirnagl et al., 1999). A região do cérebro

que é suprida unicamente pela artéria que sofreu a oclusão desenvolve o dano mais severo. À margem do centro da isquemia, uma circulação colateral é preservada, mas há morte neuronal secundária, desencadeada por processos químicos e elétricos gerados na região infartada. (Dugan e Kim-Ham, 2006).

O AVE isquêmico é uma das principais causas de óbito e incapacidade no mundo todo. Apesar disso, somente um tratamento tem eficácia clínica comprovada, porém limitada: a trombólise com o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA). Por essa razão, a pesquisa em busca de substâncias que teriam capacidade de diminuir a morte neuronal decorrente de um AVE é de fundamental importância.

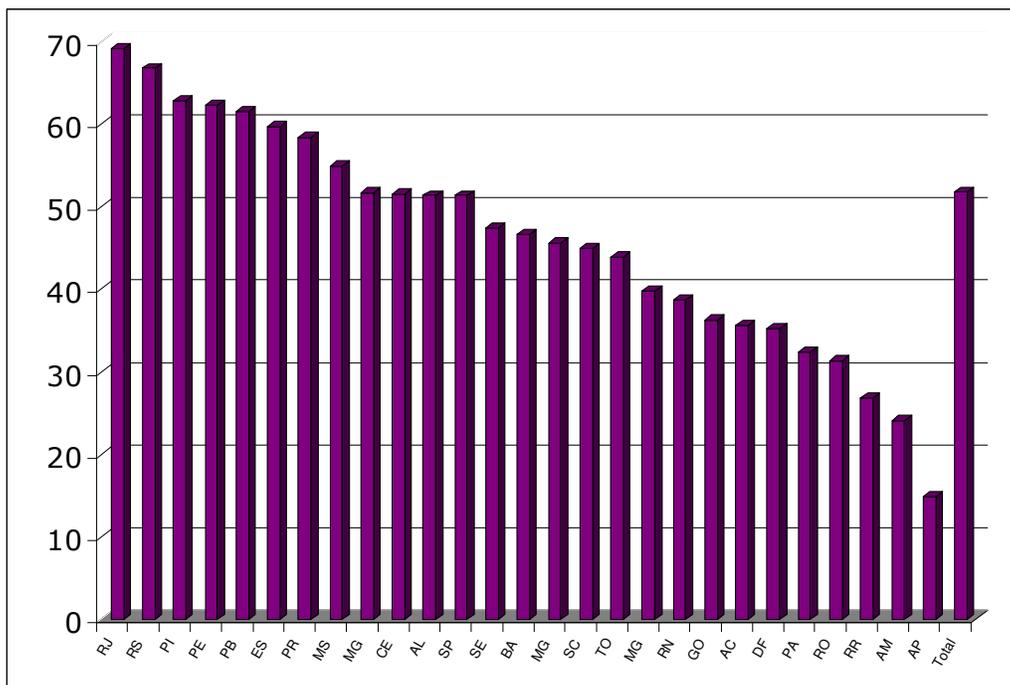
## ***1.1 EPIDEMIOLOGIA DO AVE***

Anualmente, cerca de 15 milhões de pessoas sofrem AVE no mundo todo. Desses 15 milhões de pacientes, 5 milhões vão ao óbito e um número igual se torna dependente de assistência para atividades do cotidiano (Kurth e Logroscino, 2006). Segundo os dados de 2004 da OMS, o AVE é a segunda maior causa global de mortes e a primeira entre os países de renda média, na classificação do Banco Mundial (World Health Organization, 2008; Feigin et al., 2003).

As doenças cerebrovasculares, como o AVE, estão também entre as principais causas de óbito no Brasil, correspondendo a 9,2% das causas de óbito no país (Datusus, 2007). Os AVEs têm pico de incidência entre a 7ª e 8ª décadas de vida quando se somam com as alterações cardiovasculares e metabólicas relacionadas à idade. A incidência do AVE no Brasil entre

pacientes com idade inferior a 55 anos é de 10% e em pacientes com idade inferior a 45 anos é de 3,9% (Zétola et al., 2001).

Dados do DATASUS mostram que o estado do Rio de Janeiro está em primeiro lugar na proporção de óbitos por AVE, como mostra a Figura 1:



**Figura 1:** Taxa de mortalidade específica (número de óbitos por 100.000 habitantes) para doenças cerebrovasculares por unidade de federação. Fonte: DATASUS, 2006

Apesar dos avanços das estratégias na prevenção e no gerenciamento dos AVEs, existem poucas evidências do sucesso na clínica e, assim, há incerteza no que diz respeito à capacidade de coibir uma iminente epidemia, especialmente nos países em desenvolvimento. Dentro de poucas décadas, o AVE se tornará um problema de saúde pública ainda maior nesses países em desenvolvimento, devido ao aumento na expectativa de vida e às mudanças no estilo de vida (Saposnik e Del Brutto, 2003). Esses países englobam cerca de 2/3 do total de óbitos no mundo todo (Feigin et al., 2003).

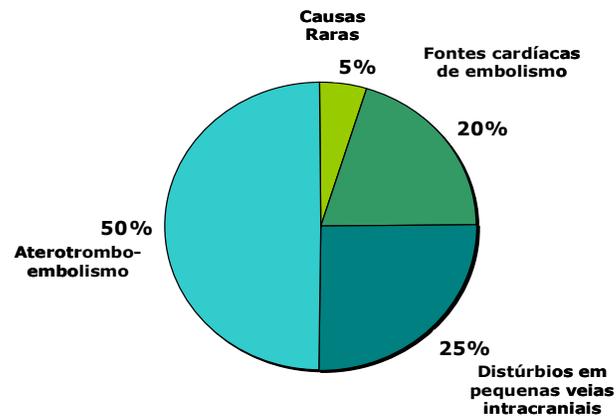
As complicações tardias são as mais comuns. A morte precoce após o infarto é geralmente devida a complicações do dano cerebral causado após a injúria. Aproximadamente 30% dos pacientes morrem um ano após o infarto. A recuperação se dá através da sobreposição de vários processos. Nas primeiras horas e dias, esses processos podem incluir diminuição da isquemia, do edema cerebral e de comorbidades (p.ex., infecções) que acabam por agravar os efeitos funcionais do infarto em si. Mais tardiamente, a plasticidade neural, tanto a que ocorre fisiologicamente quanto por fisioterapia, podem levar à recuperação de algumas funções. Dos que sobrevivem, quase metade se tornam dependentes de cuidados. A prevalência de demência pós-infarto é de aproximadamente 30%. Ter um infarto cerebral duplica o risco de demência.

#### **FATORES DE RISCO**

Em caucasianos, aproximadamente 50% dos AVEs isquêmicos são atribuídos a doenças aterotrombóticas em artérias extracranianas ou, menos comumente, artérias intracranianas maiores. Aproximadamente 20% dos AVEs isquêmicos surgem da formação de êmbolos vindos do coração; cerca de 25% são denominados infartos lacunares, provavelmente causados pela oclusão de artérias menores e mais profundas; o restante se deve a uma miscelânea de causas mais raras (Figura 2).

Os fatores de risco para o AVE podem ser divididos em 2 grupos: os modificáveis (AVE isquêmico prévio, doença da artéria carótida, fibrilação atrial, outros tipos de doenças cardíacas, hipertensão arterial, tabagismo, hiperlipidemia, diabetes *mellitus*, sedentarismo, alcoolismo, terapia de reposição hormonal e processos inflamatórios) e os não-modificáveis (idade,

etnia e histórico familiar) (Cunningham, 1992). Destes, cinco fatores de risco clássicos são de maior interesse, do ponto de vista populacional: hipertensão, tabagismo, sedentarismo, diabetes e fibrilação atrial. Juntos, esses cinco fatores de risco são responsáveis por mais de 2/3 dos infartos cerebrais (OMS, 2006).



**Figura 2:** Causas do AVE no mundo. Dados da OMS 2006

## **1.2. FISIOPATOLOGIA DO AVE**

O cérebro é altamente vulnerável a mudanças no suprimento sanguíneo. Anóxia e isquemia com duração de segundos podem causar sintomas neurológicos e, com duração de minutos, já podem causar danos irreversíveis ao tecido nervoso (Brust, 2000). Existem basicamente dois tipos de modelos animais de isquemia cerebral: a isquemia focal, que corresponde clinicamente ao infarto isquêmico, e a isquemia global, que reproduz os danos decorrentes de uma parada cardíaca ou de hipotensão consequente de procedimentos cirúrgicos. Os modelos de isquemia focal ainda podem diferir entre isquemias transientes, com oclusão de até 3 h de duração (em modelos animais) e até 24 h (em humanos), ou permanentes (Durukan e Tatlisumak, 2007). A maioria dos

modelos animais de AVE foi desenvolvido a partir da indução da isquemia cerebral no território da artéria cerebral média (ACM), a fim de ser relevante para a clínica, já que a oclusão dessa artéria é a de maior incidência, representando cerca de 1/3 dos infartos isquêmicos (Olsen, 1986). Além desses casos de isquemia, existe também a isquemia neonatal, onde 80% desses casos também ocorre no território suprido pela ACM (Ashwal e Pearce, 2001).

A ACM é uma ramificação da carótida interna, originada onde esta bifurca, no nível do arco zigomático. A ACM fornece sangue para a maior parte do córtex e substância branca da convexidade do hemisfério, incluindo os lobos frontal, temporal, parietal, temporal e occipital. A interrupção de sangue nessa artéria leva aos sinais e sintomas mais comumente causados por um AVE, tais como: fraqueza contralateral, perda sensorial, e hemianopsia homônima e, dependendo do hemisfério envolvido, pode levar a distúrbios na fala ou perda da percepção espacial (Brust, 2000). Estudos histopatológicos demonstraram em modelos de oclusão de 6 h da ACM, em ratos, que a isquemia cobre 10% do hemisfério 1 h após oclusão, 22% após 2 h, 38% após 6 h e 50% após 12 h (Garcia et al., 1993).

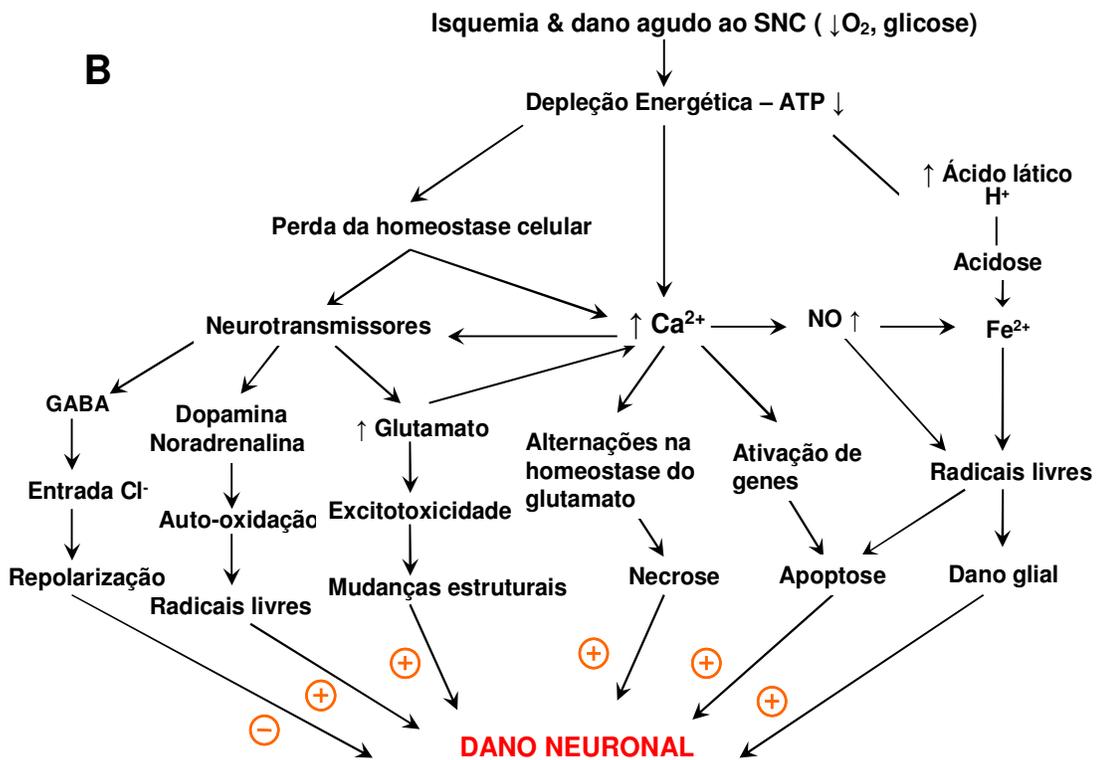
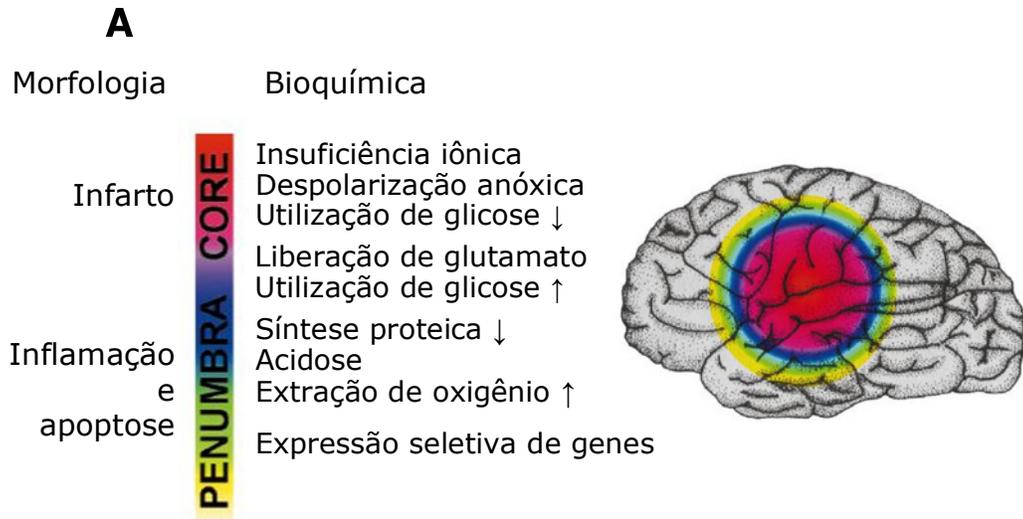
O dano decorrente da privação súbita de oxigênio e glicose ocorre em duas etapas. O primeiro momento, marcado pela degeneração aguda, está associado à abertura dos canais de cátions, ocorrendo um influxo de  $\text{Na}^+$ , despolarização da membrana, seguido de influxo de  $\text{Cl}^-$  e água levando, assim, ao dano celular. Um segundo momento, marcado por uma degeneração neuronal tardia, com estimulação dos receptores de aminoácidos excitatórios, principalmente os do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA), e ativação de canais de

cálcio, permitindo a penetração intracelular exagerada de cálcio, o qual nestas condições desencadeia eventos de cascatas enzimáticas, que culminam com a morte neuronal (Kristian e Siesjo, 1998; Siesjo, 1994; Choi et al., 1987).

### **NÚCLEO ISQUÊMICO E ZONA DE PENUMBRA**

A área isquemiada em um AVE tem uma região central denominada como núcleo isquêmico (*core*), onde há falta de suprimento energético e mau funcionamento das bombas iônicas imediatamente após a oclusão da artéria. Essa região é de menor importância nos estudos envolvendo neuroproteção, pois nela o dano gerado é basicamente irreparável (Figura 3A).

A zona de penumbra é uma região primeiramente descrita por Astrup et al. em 1981 em modelos de isquemia focal – podendo ser igualmente aplicada a modelos de isquemia global – e foi caracterizada como uma região elíptica ao redor do núcleo isquêmico. Sua ocorrência foi primeiramente descrita como um fenômeno fisiológico (Astrup et al., 1981). A região de penumbra parece se manter estável por algumas horas na isquemia focal e, por conta disso, é essa região o alvo principal das pesquisas focadas na busca por fármacos neuroprotetores. A diferenciação entre áreas potencialmente viáveis e irreversivelmente lesadas do tecido isquemiado pode facilitar a avaliação e tratamento dos pacientes.



**Figura 3: Penumbra Isquêmica:** A: eventos ocorridos à margem do centro da isquemia, levando ao espalhamento da lesão devido aos eventos subseqüentes à privação de oxigênio e glicose; B: Detalhamento de alguns dos eventos celulares que desencadeiam na morte neuronal. (Retirado e adaptado de Dirnagl, 1999)

### 1.2.1. PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE ASSOCIADA AO AVE

A depleção energética decorrente da isquemia leva à queda da concentração de ATP no tecido nervoso. Isto leva a um mau funcionamento das bombas iônicas dependentes de ATP, tais como Na/K/ATPase, o transportador mais importante para a manutenção dos altos níveis de  $K^+$  intracelular e baixos níveis de  $Na^+$  intracelular. O mau funcionamento dos gradientes iônicos transmembranares leva à despolarização da membrana, abertura de canais iônicos dependentes de voltagem e a uma cascata de eventos subseqüentes que, se forem mantidos, levam à morte celular de neurônios não afetados agudamente. O dano agudo ao tecido nervoso comumente progride após o episódio isquêmico através de substâncias que podem atuar tanto por via intra como intercelular, tais como cálcio, radicais livres de oxigênio, ácidos láctico e araquidônico, diversos mediadores químicos e, especialmente, o glutamato (Lee et al., 1999). Dependendo das circunstâncias, a morte pode ser restrita a uma população de neurônios mais vulneráveis ou pode envolver todas as células numa região do cérebro, sendo denominada de *infarto tecidual*. Segundos após um insulto isquêmico, a atividade elétrica normal do cérebro cessa no local da lesão, como resultado da ativação de canais membranares de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  e  $Cl^-$  levando ao espalhamento da hiperpolarização neuronal (Hassel e Dingledine, 2006).

Inúmeros trabalhos apontam o glutamato como sendo fundamental na propagação da lesão (Obrenovitch e Urenjak, 1997), pois, sendo liberado pelas células lesadas, é capaz de levar à morte neurônios não comprometidos, num processo denominado *excitotoxicidade*. Existem evidências desse processo

estar associado a uma série de doenças neurológicas, tais como, esquizofrenia, epilepsia, isquemia, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, entre outras (Waxman e Lynch, 2005).

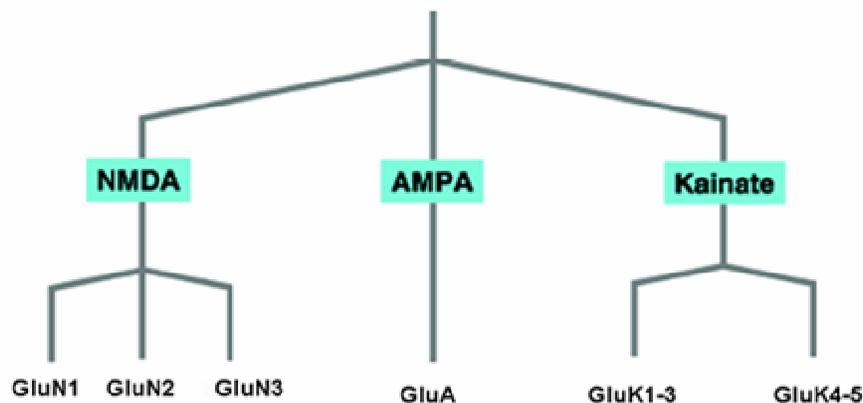
### **1.2.2. GLUTAMATO E SEUS RECEPTORES**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC presente nos mamíferos. A transmissão excitatória é um componente fundamental da integração sináptica, sendo responsável pela modulação de diversas funções motoras e não-motoras (memória, aprendizado, plasticidade neural). No entanto, este aminoácido também pode ser uma potente neurotoxina, devido justamente à sua ação excitatória em seus receptores. A esse processo, denomina-se excitotoxicidade, que parece estar envolvida no AVE, no neurotrauma e em diversos distúrbios neurológicos, tais como: doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Huntington, epilepsia e dor neuropática (Kemp e McKernan, 2002; Dingledine et al., 1999).

O processo de morte neuronal desencadeado pelo glutamato foi descoberto em 1969 em camundongos e macacos rhesus neonatos, por John W. Olney, que administrou sistemicamente o glutamato monossódico e observou danos em diversas regiões do cérebro (Olney, 1989; Olney, 1969). Esse efeito é mediado tanto por receptores metabotrópicos quanto ionotrópicos. A família dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) consiste em receptores acoplados à proteína G, modulando sistemas de segundo mensageiro diferentemente, de acordo com seus subtipos, afinidade pelo glutamato e acoplamento à G $\alpha$ .

Já a família dos receptores ionotrópicos se divide em 3, e são denominadas de acordo com o agonista seletivo prototípico. Os receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato são canais catiônicos ativados por ligantes, com rápida dessensibilização e permeabilidade ao cálcio bem reduzida, dependendo das subunidades. Esses receptores têm um papel importante na excitotoxicidade, no entanto, na maior parte das vezes, a excitotoxicidade requer ativação de receptores de NMDA, um canal catiônico que é altamente permeável ao cálcio, porém, de lenta dessensibilização. O receptor NMDA é uma proteína heterotetramérica cuja ativação requer a ligação em quatro sítios: dois sítios para o glutamato e dois sítios para a glicina ou a D-serina, estas últimas agindo então como coagonistas. Simultaneamente à ligação nesses quatro sítios, é necessária a despolarização da membrana, para que haja mudança na conformação do receptor e, desta forma, deslocando o íon  $Mg^{2+}$  que, em condições de repouso da membrana, está bloqueando seu poro iônico (Kandel e Siegelbaum, 2000c). Esse receptor é o que possui maior afinidade pelo glutamato e não sofre dessensibilização completa na presença do agonista. Com a exposição prolongada ao glutamato, a ativação de receptor NMDA leva ao aumento de cálcio intracelular, que superexcita os neurônios, eventualmente levando à morte celular. Embora tanto os receptores AMPA-cainato quanto mGluR modulem a concentração de cálcio intracelular, o aumento de cálcio gerado pela ativação desses receptores está menos frequentemente associada à excitotoxicidade (Villmann e Becker, 2007; Waxman e Lynch, 2005; Lynch e Guttman, 2002; Choi et al., 1987; Olney, 1969).

Seis famílias de genes codificam as subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato: uma única família de receptores AMPA, dois para cainato e três para NMDA (Figura 4). Combinações dessas diferentes subunidades produzem receptores funcionais. A variedade de combinações possíveis e diferenças regionais de expressão das subunidades conferem aos receptores propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas diversas como, por exemplo, a permeabilidade ao cálcio (Kandel e Siegelbaum, 2000b; Dingledine et al., 1999).



**Figura 4:** As 3 principais subfamílias dos receptores ionotrópicos de Glutamato. Retirado de Villmann & Becker, 2007.

## EXCITOTOXICIDADE

Com a queda de ATP associada à interrupção da circulação sanguínea e o mau funcionamento das bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ , a manutenção dos gradientes iônicos através das membranas plasmáticas, vesiculares e mitocondriais é comprometida. No que diz respeito ao glutamato, essa situação significa que os transportadores da membrana plasmática, que são guiados pelo gradiente de sódio, são revertidos e, dessa forma, permitem a saída de glutamato da célula (Figura 5). Essa reversão do transporte de glutamato

ocorre rapidamente, já que a disponibilidade de ATP é baixa devido à sua curta meia-vida. Além disso, a despolarização da membrana também acarreta na abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (Hassel e Dingledine, 2006).



**Figura 5:** Diagrama de liberação de glutamato e aspartato. Reversão do transporte de glutamato/aspartato dependente de sódio decorrente da despolarização da membrana. Adaptado de Obrenovitch e Urenjak, 1997.

Os receptores pré-sinápticos de cainato são ativados pelo glutamato e também promovem sua liberação por exocitose, resultando num ciclo vicioso de insultos ao neurônio. Assim, o aumento da liberação de glutamato por transporte reverso e por exocitose pelas terminações pré-sinápticas e a ativação pós-sináptica de receptores de glutamato levam à sobrecarga intracelular de íons sódio e cálcio seguida de morte neuronal. O influxo de sódio que, secundariamente, acarreta no influxo de cloreto e água, leva à formação de edema celular, que pode causar ruptura da membrana e, finalmente, a lise celular, em um processo com características de necrose.

A eficácia da captura de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que entram via receptores de glutamato e canais de cálcio dependentes de voltagem ativados pela

despolarização e também são liberados de estoques intracelulares, pode ser distinta nos diferentes tipos de neurônios. Esse aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular também conduz à formação de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. O  $\text{Ca}^{2+}$  e as espécies reativas de oxigênio podem ativar a via intrínseca de apoptose, com liberação de citocromo C, ativação de caspases e morte celular.

Um resumo esquematizado dos eventos ocorridos após depleção energética e hipóxia encontra-se ilustrado na Figura 6.

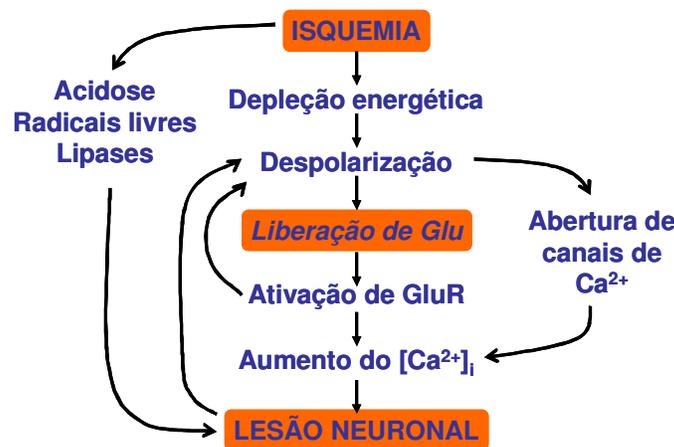


Figura 6: Cascata de lesão neuronal decorrente de insulto isquêmico. Eventos celulares iniciados a partir da liberação excessiva de glutamato causam elevação da íons de cálcio e conseqüente lesão neuronal e morte celular. Adaptado de Hassel e Dingledine (Hassel e Dingledine, 2006).

Estudos *in vivo* e *in vitro* no SNC sugerem que ocorre tanto morte neuronal necrótica quanto apoptótica durante a lesão isquêmica e excitotóxica, dependendo da duração e intensidade do insulto. A ativação de receptores de glutamato por insulto leve, submete neurônios centrais a apoptose, mas insultos mais intensos promovem necrose. Necrose leva à lise da membrana, liberação de conteúdo celular e, assim, resultante resposta inflamatória, levando à infiltração celular local, dano vascular, edema, lesão tecidual e, finalmente, fibrose. Em contraste, a apoptose é caracterizada pelo

encolhimento celular, realocização e compactação das organelas e produção de partículas membranares contendo material intracelular, conhecidas como "corpos apoptóticos". (Lee et al., 1999; Ankarcrona et al., 1995; Bonfoco et al., 1995).

### **1.2.3. O RECEPTOR NMDA E A EXCITOTOXICIDADE**

Os receptores do tipo NMDA apresentam um papel importante no aprendizado e na memória, além de estarem envolvidos em vários distúrbios neurológicos. Eles se apresentam na forma de heterômeros, sendo compostos predominantemente de subunidades de duas subfamílias separadas – GluN1 (NR1) e GluN2 (NR2) (Nakanishi, 1992). Os receptores funcionais geralmente requerem membros de cada família e existem sob forma de heterotetrâmeros, composto de subunidades GluN1 com pelo menos um tipo de subunidade GluN2 (Waxman e Lynch, 2005) estando o sítio de ligação da glicina/D-serina presente em todas as subunidades GluN1 (Villmann e Becker, 2007).

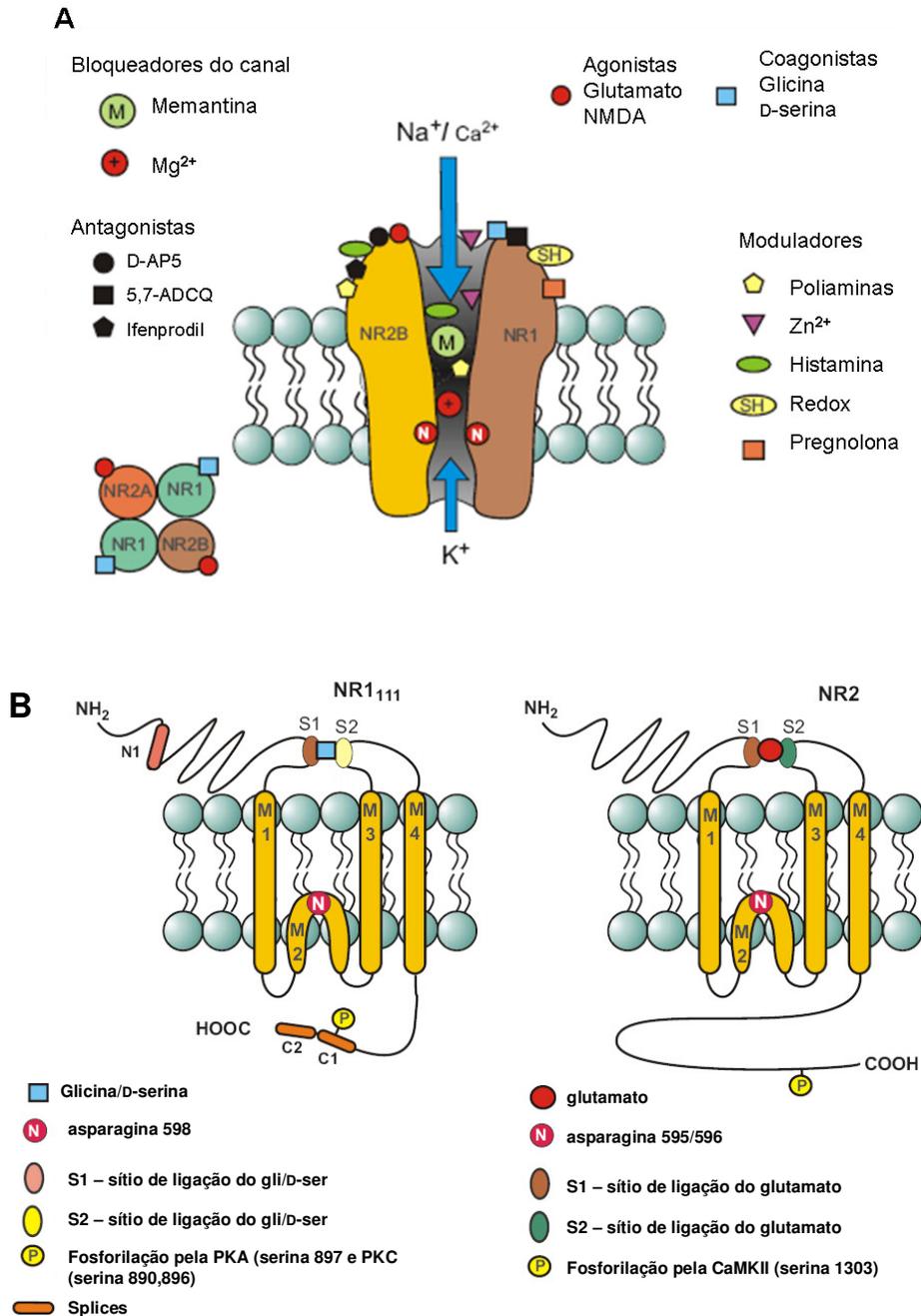
O *splicing* alternativo gera oito isoformas da subfamília NR1. As variações são decorrentes do *splicing* de três exons: um codifica a inserção de 21 aminoácidos no domínio N-terminal (N1, exon 5), e dois codificam sequências adjacentes de 37 e 38 aminoácidos no domínio C-terminal (em C1 o exon 21 e em C2, exon 22).

O canal formado pelo poro do receptor tem uma topologia transmembranar, bastante distinta de outros canais ionotrópicos. O canal é formado por um "loop" que conecta o primeiro e o segundo segmento transmembranar (ver Figura 7). As subunidades possuem três domínios

transmembranares (M1, M3 e M4) e uma região (M2) que forma uma alça imersa na membrana e constitui o domínio mais estreito do canal contendo um resíduo de asparagina (N) que determina a permeabilidade/bloqueio do canal, por cátions. Este resíduo é encontrado na posição 598 em subunidades NR1 e posição 595 ou 596 em subunidades NR2. Evidências sugerem que M2 é o principal responsável pelo bloqueio pelo  $Mg^{2+}$  extracelular (Parsons et al., 2007).

A cauda C-terminal de NR1 e NR2 liga-se a quinases sinápticas e proteínas estruturais. A subunidade NR2 intracelular contém sítios de ligação para proteína quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII), bem como os sítios de fosforilação, onde se ligam fosfolipase A (PKA), fosfolipase C (PKC). A função/tráfego do receptor podem ser influenciados por fosforilação pela PKA, PKC e CaMKII, bem como pela glicosilação

O sítio de ligação do glutamato é formado por dois lóbulos (S1 e S2): um formado por resíduos presentes na porção extracelular amino-terminal da subunidade NR2 e a outra pela alça extracelular formada pela ligação dos segmentos transmembranares M3 e M4 (Kandel e Siegelbaum, 2000a). Já a glicina/D-serina se liga aos sítios S1 e S2 da subunidade NR1 (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004).



**Figura 7: Estrutura do receptor de glutamato do tipo NMDA. A** Canal iônico ativado por ligante (glutamato e glicina/D-serina), permeável a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Magnésio e memantina se ligam no poro do receptor, bloqueando o canal. Subunidades NR1 e NR2 são compostas por vários sítios de ligação; os agonistas e os inibidores competitivos ligam-se em sítios extra-celulares de agonistas (D-AP5, 5,7-ADCQ), sítios modulatórios (ifenprodil), e ao canal iônico aberto ou fechado (MK-801). **B** Os domínios S1 e S2 formam o sítio de ligação ao glutamato no NR2 e à glicina em NR1..A alça M2 forma o “portão” do poro. A permeabilidade do poro aos cátions é altamente dependente de um resíduo de asparagina situada em M2. Retirado e adaptado de (Parsons et al., 2007).

Até certo ponto, recaptação de aminoácidos pela glia e a dessensibilização dos receptores de glutamato podem permitir que o neurônio sobreviva (Nemeth et al., 2005).

Conforme dito anteriormente, o receptor NMDA é responsável por diversos eventos associados ao aumento intracelular de cálcio. A ligação do agonista, juntamente com a ligação do co-agonista glicina ou D-serina e despolarização da membrana, leva à remoção do bloqueio do poro pelo cátion divalente de magnésio (Villmann e Becker, 2007; Lynch e Guttman, 2001; Dingledine et al., 1999).

Em níveis lesivos, o aumento do cálcio intracelular ativa, em primeiro momento, proteases cisteínicas denominadas calpaínas, que são responsáveis pela degradação de vários substratos, inclusive proteínas do citoesqueleto, receptores de membrana, e enzimas metabólicas. Segundo, esse aumento induz o estresse oxidativo, através da ativação de oxigenases, alteração do cálcio mitocondrial e metabolismo energético, e indução da peroxidação lipídica da membrana (Mattson et al., 1995). Terceiro, o cálcio desencadeia apoptose, provavelmente através da ativação de proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax, Par-4 e p53, levando a mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e ativação de caspase (Duan et al., 2001; Mattson et al., 2000).

## **ANTAGONISTAS NMDA COMO ALVOS DE NEUROPROTEÇÃO**

Teoricamente, muitos distúrbios ocorridos no SNC em que há a contribuição da excitotoxicidade induzida pelo glutamato, como o AVE,

poderiam ser tratados através do bloqueio do receptor NMDA. Inúmeras moléculas capazes de antagonizar esse receptor já tiveram efeito neuroprotetor comprovado em experimentos *in vivo*. No entanto, ensaios clínicos em AVE e lesão encefálica por trauma usando essas substâncias falharam, principalmente pela série de efeitos adversos causados. Estes incluem: alucinação, elevação da pressão sanguínea mediada centralmente e, em doses mais altas, catatonia e anestesia – efeito pelo qual os bloqueadores do poro cetamina e fenciclidina foram desenvolvidos – psicose, náusea, déficit de memória, e até mesmo morte neuronal. Por conseqüência, isso levou muitos pesquisadores a acreditarem que esse não mais deveria ser considerado alvo de um potencial medicamento neuroprotetor (Mattson, 2003; Kemp e McKernan, 2002; Lynch e Guttman, 2001). No entanto, os receptores NMDA são formados de uma série de subtipos de subunidades e, teoricamente, ao se focar no bloqueio de subtipos específicos – e entendendo suas diferentes funções na excitotoxicidade – pode-se atingir um tratamento mais adequado. Por exemplo: antagonistas de receptores que contêm a subunidade GluN2B são muito eficazes em modelos animais de doença de Parkinson e podem possuir efeito significativo tanto sozinhos quanto em combinação com agonistas dopaminérgicos (Kemp e McKernan, 2002).

O tipo celular também interfere no poder neuroprotetor de antagonistas de receptor NMDA: em cultura de neurônios hipocámpais, estas substâncias são muito eficazes, enquanto que sua eficácia é muito baixa em culturas organotípicas de neurônios motores da medula espinhal (Saroff et al., 2000). Outro fator que vem sendo recentemente estudado é a possibilidade de as diferentes subunidades do receptor de NMDA (GluN2A e GluN2B) possuírem

diferentes papéis, tanto nas vias de proteção celular quanto na modulação do dano neuronal (Liu et al., 2007).

Os antagonistas de receptor NMDA foram desenvolvidos, inicialmente, a partir da estrutura do glutamato, como é o caso do ácido 2-amino-5-fosfopentanóico, competindo diretamente no sítio de ligação do glutamato. Porém, por serem hidrofílicos, esses análogos estruturais do glutamato não atravessam a barreira hemato-encefálica, limitando seu uso na clínica. Análogos mais lipossolúveis foram desenvolvidos, entre eles selfotel, antagonista competitivo do receptor NMDA, que chegou a ser usado em testes clínicos, mas não apresentou efeito neuroprotetor significativo. Os antagonistas não-competitivos, representados pela dizocilpina (MK-801), um agente primeiramente descrito como anticonvulsivante por mecanismo desconhecido, mas que depois veio a ser caracterizado como um potente bloqueador do poro do receptor NMDA, é neuroprotetor, porém excessivamente tóxico (Lynch e Guttman, 2002).

### ***1.3. O SÍTIO DE LIGAÇÃO DA GLICINA COMO ALVO DE NEUROPROTEÇÃO***

A glicina foi primeiramente descrita como um co-agonista no receptor NMDA, atuando em sítio alostérico insensível à estricnina com potência muito alta (10 nM), por Johnson e Ascher (1987). Até então, ela era conhecida apenas como um neurotransmissor inibitório, assim como o ácido gama-aminobutírico (GABA), atuando em receptores de glicina sensíveis à estricnina e levando à entrada de íons cloreto. Alguns pesquisadores têm sugerido que o nível endógeno de glicina é suficiente para saturar completamente seu sítio no

receptor NMDA (Schell et al., 1997). Porém, um número bem relevante de autores tem sugerido que os sítios da glicina não estão sempre saturados (Czepita et al., 1996; Wilcox et al., 1996) isto porque a glicina exógena, ou ainda a D-serina exógena (também agonista deste sítio), potencializa as respostas do NMDA *in vivo* (Thiels et al., 1992; Salt, 1989; Wood et al., 1989).

A partir da descoberta da glicina e D-serina atuando como co-agonistas de receptor NMDA, esse sítio se transformou em mais um alvo de estudos envolvendo neuroproteção. Uma importante vantagem de antagonistas do sítio da glicina sobre os antagonistas do glutamato e os inibidores não-competitivos é que eles exibem efeitos adversos neurotóxicos e psicológicos menos sérios (Lees, 2000). A descoberta do ácido quinurênico (AQ) como um antagonista endógeno de receptor NMDA, cujo sítio de ligação é o sítio da glicina, descoberta esta realizada por Perkins e Stone (1982), também inspirou outras estratégias de neuroproteção. Esse fato será melhor discutido a seguir.

### **1.3.1. VIA DA QUINURENINA**

A quinurenina é obtida através do metabolismo do triptofano adquirido na dieta ocorrendo na maioria dos tecidos de mamíferos, incluindo o cérebro. Ela é responsável pela formação de NAD e NADP e ocorre em macrófagos e microglia, e parte em astrócitos (Vamos et al., 2009b; Schwarcz e Pellicciari, 2002).

A L-quinurenina (LQ) é transportada prontamente para o SNC pela barreira hemato-encefálica através de transportadores de aminoácidos neutros (Fukui et al., 1991). No cérebro, LQ é rapidamente captada por astrócitos e

células da microglia. Alguma parte também é transportada para neurônios, apesar desse processo ser mais lento e, diferente do que ocorre na glia, é altamente dependente do suprimento de Na<sup>+</sup> (Speciale e Schwarcz, 1990).

LQ serve como substrato de diversas enzimas distintas: quinureninase (produzindo ácido antranílico), 3-quinurenina-hidroxilase (gerando 3-hidroxiquinurenina) e quinurenina aminotransferases (KATs), que catalisam a transaminação irreversível da LQ para AQ.

Metabólitos da via da quinurenina podem desempenhar papéis na patogênese de vários distúrbios do cérebro humano. Um dos principais metabólitos neste caminho é formado a partir da transaminação da LQ para formar o antagonista dos receptores de glutamato, AQ, ou a partir da hidroxilação, sendo convertido à 3-hidroxiquinurenina, que por sua vez, ainda é degradada em ácido quinolínico. Ambos possuem efeito neuroativo conhecidos. O ácido quinolínico provavelmente é o metabólito mais estudado devido à sua provável ação excitotóxica ao interagir no receptor NMDA, levando a morte neuronal. AQ é o único antagonista endógeno conhecido de receptor NMDA. Por essa ação, esse metabólito é de grande interesse em distúrbios do SNC.

### **ÁCIDO QUINURÊNICO COMO ALVO DE NEUROPROTEÇÃO**

Como dito anteriormente, o AQ é o único antagonista competitivo endógeno conhecido do receptor NMDA, se ligando tanto ao sítio da glicina como também ao sítio de glutamato, porém nesse último com potência bem inferior (Hilmas et al., 2001). Mesmo sendo o único antagonista receptor NMDA conhecido, sua concentração fisiológica é baixa. Ele é um potente antagonista

do ácido quinolínico, NMDA e ácido quisquálico (um agonista do receptor AMPA e de alguns subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato) (Perkins e Stone, 1982).

A formação enzimática de AQ é determinada pela concentração intracelular do seu precursor, a LQ. A eficácia da LQ em levar ao acúmulo de AQ no cérebro é limitada pelo transporte do ácido para fora da célula e para fora da barreira hemato-encefálica (Nemeth et al., 2005)

Por seu efeito antagonista da transmissão excitatória, o interesse farmacológico sobre o AQ cresceu consideravelmente nas últimas décadas e seu papel foi estudado em vários distúrbios neurológicos, tais como: doença de Alzheimer, esclerose múltipla, epilepsia, doença de Huntington, doença de Parkinson, dor neuropática, enxaqueca e no AVE, já que é sabido que a ativação de receptores excitatórios pode ter papel importante em todas essas condições (Vamos et al., 2009b; Schwarcz e Pellicciari, 2002).

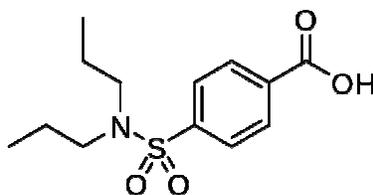
Mais recentemente, descobriu-se que o AQ é capaz de se ligar a outros tipos de receptores ionotrópicos, como o receptor de AMPA e também o receptor nicotínico  $\alpha 7$  (Hilmas et al., 2001), apesar de essa última ação não ter sido reproduzida em um trabalho mais recente, realizado por Mok e colaboradores, em 2009. Neste mesmo trabalho, foi verificado que o AQ também foi capaz de inibir, de forma reversível, correntes produzidas por GABA, de forma dependente de concentração.

Existem algumas publicações acerca do papel neuroprotetor do AQ e derivados sintéticos (Nemeth et al., 2006; Germano et al., 1987; Simon et al., 1986). Porém, em na maioria dos casos, foram necessárias altas doses de AQ, devido provavelmente à sua baixa penetração na barreira hemato-encefálica.

Pesquisas recentes têm focado no aumento de AQ no SNC através da inibição do transporte que levaria ao efluxo de AQ para a circulação sistêmica. Assim, alguns grupos fizeram uso da probenecida – seu mecanismo de ação é explicado a seguir – em combinação com administração sistêmica de LQ.

#### **1.4. PROBENECIDA**

A probenecida foi um fármaco planejado por Beyer e colaboradores, a fim de reduzir a secreção tubular da penicilina, por esta possuir uma meia-vida muito curta (Beyer et al., 1951). Sendo primeiramente denominada como Benemid®, ela possui as seguintes nomenclaturas oficiais: ácido 4-[(dipropilamino)sulfonil]benzóico (nomenclatura IUPAC) ou; ácido p-(dipropilsulfamoil) benzóico ou; ácido p-(dipropilsulfamil) benzóico.



**Figura 8:** Estrutura da probenecida. O grupamento carboxílico lhe confere seu caráter ácido, apresentando então um pKa de 3.4 (Dayton et al., 1963).

A ação da probenecida limita-se basicamente à inibição do transporte de ânions orgânicos através das barreiras epiteliais. Por esse motivo, é usada na clínica pela sua alta capacidade de inibir a secreção renal de ácidos orgânicos, diminuindo a eliminação destes e, assim, aumentando a meia-vida de fármacos como a penicilina – razão pela qual foi desenvolvida.

A probenecida é utilizada para tratar gota crônica e artrite gotosa. É utilizada para prevenir ataques relacionados com a gota, e não para tratá-los

assim que eles ocorrem. Ela atua sobre os rins para ajudar o corpo a eliminar o ácido úrico, inibindo a reabsorção tubular pós-secreção. Doses mais elevadas de probenecida são utilizadas como adjuvantes para prolongar a ação ou reduzir a nefrotoxicidade de antibióticos e antivirais de caráter aniônico. Isso geralmente se limitava àqueles pacientes tratados de infecção por gonococos e neurosífilis. Mais recentemente cresceu o uso em associação com antivirais, como o cidofovir, visando a nefroproteção em pacientes com AIDS (Lacy et al., 1998).

Probenecida é completamente absorvida após administração oral. As concentrações máximas no plasma são alcançadas em 2 a 4 horas. A meia-vida do fármaco no plasma é dependente da dose e varia de menos de 5 horas a mais de 8 horas ao longo do tratamento. Entre 85% e 95% do fármaco se ligam à albumina plasmática. Os 5% a 15% do fármaco não ligado são eliminados por filtração glomerular. A maior parte do fármaco é secretada ativamente pelos túbulos proximais. Uma pequena quantidade de probenecida glicuronizada aparece na urina. Ela também é hidroxilada, formando metabólitos ativos, pois, por ainda possuírem a função carboxila, sua atividade uricosúrica se mantém.

## **EFEITOS ADVERSOS**

A probenecida é bem tolerada. Aproximadamente 2% dos pacientes desenvolvem leve irritação gastrointestinal. O risco é maior com o uso de doses mais elevadas, e recomenda-se precaução em pacientes portadores ou com histórico de úlcera péptica. As reações de hipersensibilidade geralmente são leves e ocorrem em 2% a 4% dos pacientes. Casos de hipersensibilidade mais

grave são extremamente raros. Sobredosagem extrema de probenecida resulta em estimulação do SNC, convulsões e morte por insuficiência respiratória.

Os efeitos adversos mais freqüentes incluem dor de cabeça, anorexia, náuseas e vômitos. Outros efeitos adversos relatados incluem tonturas, rubor, dores nas gengivas, alopecia, freqüência urinária, leucopenia e anemia. A síndrome nefrótica, necrose hepática e anemia aplástica ocorrem raramente. Já foi demonstrado um efeito paradoxal da probenecida: em ratos, ela induziu hiperuricemia e, os autores atribuíram esse efeito à uma possível estimulação da probenecida na síntese do ácido úrico (Shinosaki e Yonetani, 1991).

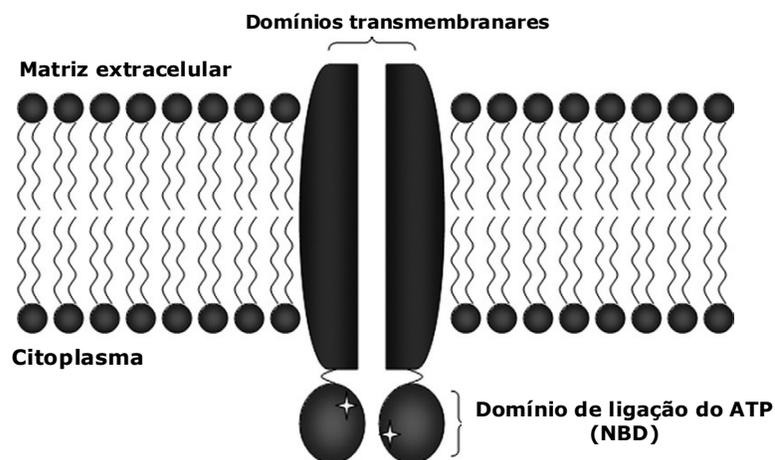
Segundo o National Toxicity Program dos EUA, a probenecida (CAS No. 57-66-9), não apresentou atividade carcinogênica em ratos. Algum efeito carcinogênico foi verificado em fêmeas de camundongos B6C3F1 baseando-se no aumento da incidência de adenomas hepatocelulares.

#### **1.4.1. AÇÕES DA PROBENECIDA**

##### **NOS TRANSPORTADORES DA FAMÍLIA ABC**

Os transportadores cuja função pode ser inibida pela probenecida pertencem à superfamília *ATP-binding cassette* (ABC). Esses transportadores possuem sítios de ligação ao nucleotídeo (NBD) (Figura 9). Eles estão amplamente espalhados por todo o organismo dos mamíferos. Já foi comprovada a existência de transportadores da família ABC tanto em neurônios quanto em células não neurais do SNC (Hirrlinger et al., 2002). Disfunções neles estão relacionadas com diversas patologias, tais como fibrose

cística, hiperinsulinemia, adrenoleucodistrofia, doença de Stargardt e resistência a múltiplas drogas (Wada et al., 1998). Até hoje, já foram identificados 48 genes da família ABC, sendo classificadas em 7 subfamílias (ABCA-ABCG) (Hermann et al., 2006; Dean et al., 2001; Dean e Allikmets, 2001). Esses transportadores estão presentes não somente na membrana plasmática, como também na membrana de outras organelas, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos e peroxissomos (Burke e Ardehali, 2007).



**Figura 9:** Representação esquemática de um transportador ABC na membrana plasmática. Os domínios transmembranares formam um poro através da membrana plasmática e se associam com os domínios de ligação de nucleotídeos, que são encontrados na face citosólica da membrana. Estrelas indicam sítios de ligação ao ATP. Um transportador ABC funcional consiste em 2 domínios transmembranares e 2 domínios de ligação à nucleotídeos. Retirado de Burke e Ardehali, 2007.

A probenecida é amplamente utilizada como ferramenta farmacológica em estudos *in vitro*, pela sua ação no transporte transmembranar. Os transportadores sensíveis à probenecida pertencentes à superfamília ABC incluem proteínas de resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance proteins*) (MRP), que estão associados à resistência adquirida aos quimioterápicos em células tumorais (Kim et al., 2001; Feller et al., 1995),

transportadores de ânions orgânicos (OAT) - um subgrupo da família ABC recém-identificado – subgrupos OAT 1, 3 e 4 (Eraly, 2008; Kang et al., 2005; Sekine et al., 2000;), e polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (Huisman et al., 2005; van Aubel et al., 2002).

A probenecida tem sido amplamente empregada como ferramenta farmacológica no carregamento intracelular de agentes fluorescentes aniônicos, por exemplo, para medir entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Peters et al., 1998; Ruttner et al., 1993). Essa aplicação se deve à sua ação nos transportadores de ânions, sabendo que sua adição significaria um melhor carregamento, já que ela impediria a saída do agente fluorescente. Alguns estudos relatam efeitos não-específicos da probenecida, entre eles está a alteração da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  (Scheenen et al., 1994), e redução do consumo de  $\text{O}_2$  (Choi e Kim, 1992). Scheenen e colaboradores concluíram que a probenecida pode aumentar a probabilidade de abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ou inibir mecanismos de extrusão. Já Choi e Kim verificaram que probenecida inibiu o consumo de oxigênio significativamente em concentrações acima de 3 mM.

Um trabalho realizado no ano passado verificou a relação entre inibidores de OAT3 e a diminuição da pressão sanguínea. Entre os inibidores testados, foi usada a probenecida. Ela provoca uma redução aguda da pressão sanguínea, enquanto que outros 3 inibidores menos potentes não produzem esse efeito (Eraly, 2008).

## **EM OUTROS ALVOS**

Descobertas mais recentes revelaram que a probenecida também é capaz de inibir o transporte de cátions orgânicos a partir do momento em que

se verificou que ela é capaz de diminuir a depuração de alguns fármacos de caráter positivo, tais como cimetidina e famotidina (Gisclon et al., 1989) e ciprofloxacino (Jaehde et al., 1995), através da inibição de um componente ativo de excreção. Isso é um dado bem interessante, pois estruturalmente, a probenecida e esses fármacos não possuem semelhança. Em vesículas membranares luminais isoladas de túbulos renais, também foi verificada interação da probenecida com trocadores de cátions orgânicos presentes nessa membrana (Ott et al., 1990; Hsyu et al., 1988), e presumiu-se uma inibição do tipo competitiva.

A probenecida é capaz de diminuir a toxicidade gastrointestinal induzida por irinotecan (CPT-11), que é capaz de provocar diarreia aquosa e redução de peso corporal. Os autores concluíram que essa redução dos efeitos adversos foi devida à ligação da probenecida com metabólitos ativos desse fármaco (Horikawa et al., 2002).

Em 1997, Chung e colaboradores verificaram que a probenecida diminuiu significativamente a agregação plaquetária induzida por trombina, além de demonstrarem que ela também diminuiu a toxicidade induzida por menadiona, através da quantificação de LDH liberada em cultura de plaquetas (Chung et al., 1997).

Masereeuw e colaboradores demonstraram que probenecida é capaz de desacoplar fosforilação oxidativa mitocondrial, reduzir os níveis celulares de ATP e despolarizar a membrana plasmática, em concentrações acima de 1 mM, o que demanda muito cuidado ao se trabalhar com concentrações milomolares de probenecida em estudos onde ela é usada como ferramenta farmacológica (Masereeuw et al., 2000).

A probenecida mostrou ser um potente inibidor de panexinas, um canal de liberação de ATP (Silverman et al., 2008), já se sabendo que ela é capaz de bloquear a liberação de ATP em astrócitos (Darby et al., 2003; Ballerini et al., 2002).

### **NO TRANSPORTE DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS**

AMPc e GMPc (monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina), são nucleotídeos descritos como os primeiros segundos mensageiros (Ashman et al., 1963; Sutherland e Rall, 1958;). Essas moléculas desempenham amplo papel na sinalização celular, regulando diversos alvos intracelulares como proteínas cinases, canais iônicos e fosfodiesterases (PDE).

A probenecida é capaz de bloquear o efluxo de AMPc e GMPc e existem inúmeras publicações mostrando esse efeito em diversas linhagens de células, inclusive em cultura de neurônios (Rosenberg et al., 1994). Estudos revelaram que os níveis renais de AMPc caem depois de tratamento com probenecida, e a concentração plasmática de AMPc aumenta proporcionalmente, de forma a não alterar os níveis na urina (Gogel et al., 1983). No entanto, até recentemente, ainda não se tinha esclarecido a identidade do transportador e se o GMPc também seria transportado pelo mesmo receptor (van Aubel et al., 2002). Hoje já é sabido que a probenecida é capaz de inibir o efluxo de GMPc em eritrócitos e células hepáticas (Schultz et al., 1998; Flo et al., 1995; ; Tjornhammar et al., 1986; Tjornhammar et al., 1983). Com a clonagem de diversas proteínas de transporte, houve a recente identificação e caracterização de transportadores sensíveis à probenecida para GMPc e AMPc, integrantes da família de proteínas ABC (van Aubel et al., 2002). Os

subtipos MRP4 e MRP5 estão especialmente relacionados ao transporte de nucleotídeos cíclicos e análogos de nucleotídeos (Chen et al., 2001; Jedlitschky et al., 2000).

O efeito da probenecida no transporte de nucleotídeos foi muito pouco estudado em outras células que não as epiteliais. Em células musculares esqueléticas, a probenecida, a uma concentração de 100  $\mu$ M diminui o acúmulo extracelular de AMPc, demonstrando que a liberação de nucleotídeos cíclicos em células musculares é mediada por um transportador de ânions orgânicos sensível à probenecida (Godinho e Costa, Jr., 2003).

## **No SNC**

Como já foi esclarecido, o AQ pode ter um papel na neurodegeneração. Como seu potencial papel terapêutico não é de grande valor devido à sua baixa penetração no SNC, alguns grupos exploraram mecanismos que pudessem alterar indiretamente seus níveis dentro do SNC. As estratégias incluem desde a manipulação das enzimas da via da LQ (Rossi et al., 2008; Pellicciari et al., 2006; Knyihar-Csillik et al., 2004; Moroni et al., 1988), passando pelo uso de análogos do triptofano (Russi et al., 1989) e de AQ (Nemeth et al., 2006; Robotka et al., 2005), até chegar ao uso de ferramentas farmacológicas que, de alguma outra maneira, pudessem elevar a concentração de AQ no SNC. Aí enquadra-se, por exemplo, o uso de inibidores dos transportadores membranares presentes na barreira hemato-encefálica, que são responsáveis pela extrusão de AQ do SNC.

Administração sistêmica de probenecida sozinha é capaz de elevar os níveis de AQ em várias regiões, não só do SNC como também em órgãos

periféricos, tais como coração, rim e fígado (Lou et al., 1994). Além disso, a probenecida adicionada ao fluido de diálise aumenta em 300% os níveis de AQ, no meio extracelular hipocampal (Russi et al., 1992).

Pré-administração sistêmica de LQ com probenecida por 5 dias diminuiu significativamente o dano em neurônios piramidais após lesão isquêmica induzida por oclusão de 4 vasos (4-VO) em ratos adultos (Sas et al., 2008). A administração sistêmica de LQ sob forma de sal de sulfato é capaz de inibir convulsão induzida por pentilenotetrazol e a hipermotilidade induzida por isquemia (Nemeth et al., 2004).

A probenecida em combinação com LQ também já foi estudada em modelos de enxaqueca induzida pela injeção de nitroglicerina, onde essa combinação foi capaz de diminuir a atividade neuronal. Esse efeito foi atribuído ao aumento dos níveis de AQ (Vamos et al., 2009a; Knyihar-Csillik et al., 2007). Na década de 90, um grupo de pesquisadores do Reino Unido, fez alguns estudos onde o mecanismo de ação da probenecida no SNC era o foco. Nesses estudos eles avaliaram primeiramente o efeito da probenecida nas alterações da homeostase ácido-base extracelular na isquemia cerebral, sabendo que algumas dessas mudanças são alteradas pela inibição dos sistemas de transporte de ácidos orgânicos. O objetivo do estudo era analisar as mudanças de  $\text{CO}_3^{2-}$  extracelular e da concentração de lactato produzido após isquemia, especialmente em relação à ocorrência de despolarização anóxica. (Taylor et al., 1996).

O trabalho seguinte visava avaliar o efeito da probenecida na depressão alastrante (DA), também conhecido como Ondas de Leão, por ter sido primeiramente descrito por Aristides Leão, em 1944. Esse fenômeno se

caracteriza pela propagação da supressão transitória da atividade elétrica associada à despolarização celular e está associado à enxaqueca e à despolarização ocasionada após isquemia. A indução deste fenômeno *in vitro* consiste na adição de  $K^+$  ao meio extracelular. Durante a investigação envolvendo a recaptação de lactato (cujo transporte é sensível à probenecida) – descrição supracitada – após despolarização induzida por  $K^+$ , este grupo descobriu que a probenecida reduziu o número de DA's induzidas por  $K^+$  no estriado de ratos. A partir dessa informação, verificaram, então, o efeito direto da probenecida na DA, com a finalidade de fundamentar essa observação preliminar, e de examinar alguns dos possíveis mecanismos que podem estar atrelados à esta ação. Eles puderam demonstrar que a aplicação direta de probenecida no corpo estriado de ratos inibe DA induzida por  $K^+$ . Concluíram que esta ação pode ou não estar ligada ao bloqueio da ativação dos receptores NMDA (Taylor et al., 1997);

O último trabalho realizado ainda envolvendo essa temática foi a avaliação da probenecida na despolarização induzida através da aplicação de NMDA no estriado, onde este grupo agregou a informação de que a probenecida sozinha era capaz de aumentar a concentração de AQ à sua capacidade de inibir a DA induzida por  $K^+$ . Foi verificado que 20 mM de probenecida reduziu significativamente a resposta induzida por NMDA. Neste trabalho, os autores discutem o potencial efeito neuroprotetor da probenecida, levantando algumas hipóteses, não só discutindo seu efeito no aumento de AQ, como também o envolvimento da probenecida no transporte de GMPc.

Kakee e colaboradores mostraram o aumento do acúmulo de GABA pela adição de probenecida em uma linhagem de células endoteliais dos capilares do cérebro de camundongo (MBEC4) (Kakee et al., 2001).

Mesmo com esses dados da probenecida e quinureninas, o único artigo que avaliou o efeito neuroprotetor da probenecida sozinha em lesão isquêmica foi de Nozaki e Beal, em 1992, em modelo de hipóxia-isquemia neonatal e lesão induzida por NMDA. Assim como nas outras publicações envolvendo quinureninas, seu intuito era utilizar a probenecida apenas como coadjuvante, a fim de aumentar a concentração de AQ no SNC. Nesse trabalho, foi visto em um grupo de animais em que a probenecida foi administrada sozinha, antes da indução da lesão (50 e 100 mg/kg), que esta foi capaz de diminuir o volume do infarto. Entretanto, este dado não foi valorizado ou sequer discutido no artigo (Nozaki e Beal, 1992). Este grupo é o mesmo que verificou as alterações nos níveis de AQ com administração sistêmica de probenecida, já citado (Miller et al., 1992).

Em junho de 2009, no entanto, foi publicado por Vamos e colaboradores, um trabalho avaliando o efeito neuroprotetor da probenecida em modelo animal de doença de Huntington, já que esta patologia tem sido relacionada com a redução dos níveis de AQ em algumas regiões do cérebro de pacientes. Foi verificado que a sobrevivência de camundongos N171-82Q (animais transgênicos para doença de Huntington) foi 35% maior nos animais tratados com 150 mg/kg de probenecida, 3 vezes por semana, por 6 semanas. Além disso, houve melhora motora, redução da morte neuronal e do número de agregados intranucleares neuronais (Vamos et al., 2009c). Este foi o primeiro estudo cujo foco era o efeito neuroprotetor da probenecida.

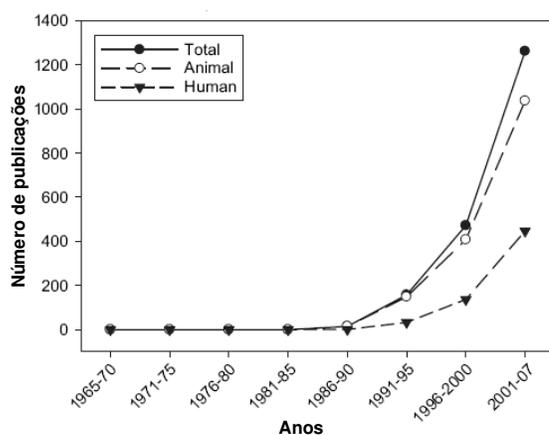
Portanto, há indícios do efeito neuroprotetor da probenecida quando administrada antes da lesão e também em modelo de neurodegeneração crônica. No entanto, a probenecida não foi testada na isquemia cerebral em esquema de administração após a lesão, que teria maior relevância clínica. Além disso, nunca foi levantada a hipótese de um efeito direto da probenecida nas células neurais, independente das alterações no transporte pela barreira hemato-encefálica.

### ***1.5. BUSCA POR FÁRMACOS NEUROPROTETORES***

A neuroproteção se define como a estratégia, ou a combinação delas, que antagonize, interrompa ou diminua a sequência de danos bioquímicos e eventos moleculares que, se nada for feito, pode gerar injúrias irreversíveis no tecido nervoso. O dano agudo causado pelo AVE é irreversível, entretanto, o processo químico e elétrico desencadeado após o insulto pode durar horas e até dias e é justamente esse processo o foco dos estudos que visam a diminuição da morte neuronal.

Até o início da década de 90, praticamente não havia publicações envolvendo a busca por moléculas que poderiam diminuir a morte neuronal após um AVE, enquanto que, nos últimos 10 anos, houve um crescimento altamente considerável, como pode-se ver na figura 10). Esse crescimento acompanhou uma evolução no avanço dos estudos acerca da fisiopatologia da doença e, com isso, o surgimento de novos possíveis alvos passíveis de intervenção farmacológica (Ginsberg, 2008). Mesmo não havendo descobertas definitivas no tratamento da doença, não se pode negar o avanço ocorrido nas

últimas décadas, não só na fisiopatologia como também na prevenção e no diagnóstico do AVE.

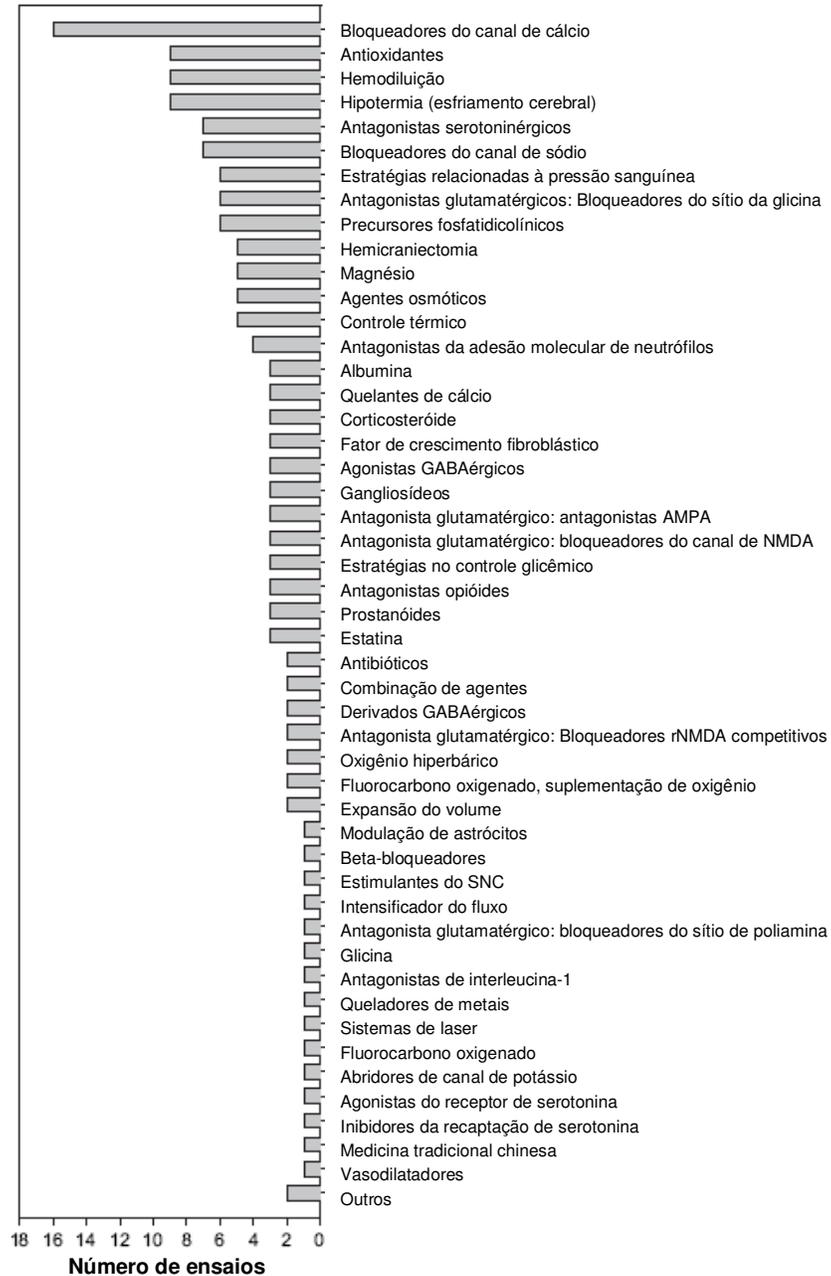


**Figura 10:** Número de publicações na MEDLINE com o tema neuroproteção em AVE/isquemia, de 1995 até 2007. Retirado de Ginsberg et al, 2008

Conforme dito, o tratamento disponível na clínica atualmente se resume ao rt-PA, um agente trombolítico. Porém, o uso deste medicamento é extremamente limitado por alguns fatores: o tempo de administração, pois o rt-PA deve ser usado até 3 h após o insulto acoplado à necessidade de avaliação técnica e um diagnóstico por imagem; e o risco inerente de causar hemorragia (Lees, 2000).

Além dos antagonistas do receptor NMDA, existem vários outros alvos de neuroproteção, como se pode ver na figura 11. Antagonistas de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem têm tido efeito neuroprotetor relatado em algumas publicações (Weiss et al., 1990; Blanc et al., 1998). Antagonistas dos receptores do tipo AMPA/cainato, demonstraram eficácia em modelos animais de isquemia, enquanto que a proteção não foi observada ou foi mais fraca do que a oferecida por antagonistas do receptor NMDA em cultura de neurônios que sofreram isquemia (Belayev et al., 1995). Outro alvo que é dada bastante atenção são os agentes antioxidantes, já que existem muitas evidências de que

os radicais livres estão envolvidos no dano ao tecido cerebral, o que gerou o desenvolvimento de substâncias que poderiam remover esses radicais livres (Green, 2008).



**Figura 11:** Ensaios *clínicos* de candidatos à neuroprotetores em AVE. Retirado de Ginsberg et al, 2009.

Por seu histórico de uso clínico com baixa toxicidade e pelos indícios na literatura de efeitos que poderia ser benéficos na lesão cerebral isquêmica, consideramos que a probenecida é um potencial fármaco neuroprotetor.

## 2. OBJETIVOS

Temos como objetivo avaliar o potencial neuroprotetor da probenecida de duas maneiras diferentes:

- *in vitro*: em cultura de células corticais de ratos, através do modelo de lesão neuronal induzida por glutamato + D-serina, baseando-se na abordagem clássica de neuroproteção envolvendo os receptores excitatórios

- *in vivo*: em camundongos, através do modelo de AVE por oclusão permanente da artéria cerebral média.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS**

Os ratos utilizados nos experimentos *in vitro* foram obtidos e mantidos no Biotério Central do Centro de Ciências de Saúde (CCS) da UFRJ. Os camundongos utilizados nos experimentos *in vivo* foram obtidos do Biotério Central de Microbiologia e mantidos no Biotério da Farmacologia. Os animais foram mantidos sob as normas internacionais de cuidados. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais (CEUA) do CCS / UFRJ, atendendo pelo número do protocolo DFBICB 029.

#### **3.2. ENSAIO DE DANO INDUZIDO POR GLUTAMATO**

##### **3.2.1. CULTURA DE CÉLULAS CORTICAIS**

Culturas de células corticais mistas, contendo neurônios e glia, foram preparadas com córtex cerebral de fetos de rato. Ratas Wistar com 18-20 dias de gestação foram sacrificadas, por deslocamento cervical, sob narcose profunda por CO<sub>2</sub>. O útero foi removido cirurgicamente, mediante abertura do abdome, os fetos foram retirados da placenta e sacrificados rapidamente por decapitação. Os encéfalos foram retirados da caixa craniana e os hemisférios cerebrais dissecados. A cada etapa o material era transferido para placas de Petri contendo solução salina de Puck gelada sem cálcio (solução de dissecação), que tinha a seguinte composição (em mM): NaCl 137; KCl 5,4;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,17;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,22; dextrose 17 e ácido *N*-2-hidroxietil-piperazina *N'*-2-etanossulfônico (HEPES) 10, pH=7,3 e osmolalidade de 325 mOsm/kg. Primeiro as meninges foram retiradas, depois o hipocampo e, por último, a maior parte do tecido subcortical. Ao final da dissecação os córtices cerebrais eram picados e incubados com tripsina (Cultilab, BR) 0,25%, por 25 a 30 min a 35°C. A tripsinização era interrompida por três etapas de passagem e decantação sucessivas em meio de plaqueamento, denominado “MEM 10/10”. Este consistia de meio essencial mínimo com sais de Earle (MEM, Gibco, EUA, ou Cultilab, BR), suplementado com L-glutamina 1 mM, glicose 33 mM (6 g/L), bicarbonato de sódio 44 mM (3,7 g/L), soro fetal bovino (10% v/v, Cultilab, BR) e soro de cavalo (10% v/v, Laborclin, BR) e uma desoxirribonucleotidase (DNAse, 20 mg/mL, tipo II, Sigma, EUA). As células corticais eram então dissociadas por trituração com aspirações sucessivas com pipeta Pasteur, até que se obtivesse uma suspensão homogênea. A suspensão era filtrada através de três lenços de gaze de algodão estéril, para separar fragmentos não dissociados.

Placas de 24 poços (TPP–Testplatte, Suíça) eram previamente tratadas com substrato de poli-L-lisina (Sigma, EUA), aplicando-se 1,5 mL de solução 40 µg/mL em cada poço e aspirando o excesso no dia seguinte. Plaqueava-se as células corticais dissociadas na proporção de 4 ou 5 hemicórtex por placa (0,4 ou 0,5 hemicórtex por mL), sendo 0,4 mL por poço, e as placas eram mantidas em estufa umidificada a 35°C com 10% de CO<sub>2</sub> na atmosfera. Após 24 horas, 50% do meio de plaqueamento era trocado por meio de manutenção “MEM 10” (MEM, sem soro fetal bovino ou DNAse), e eram adicionados agentes antimetabólicos, solução de uridina e 5-flúor-2-desoxiuridina (1 e 2 mg/mL,

respectivamente), para diminuir a proliferação de células gliais. Trocava-se o meio duas vezes por semana. Após 14-18 d em cultura, a cultura era usada nos experimentos de neurotoxicidade e neuroproteção.

### **3.2.2. DANO INDUZIDO PELO GLUTAMATO (DIG)**

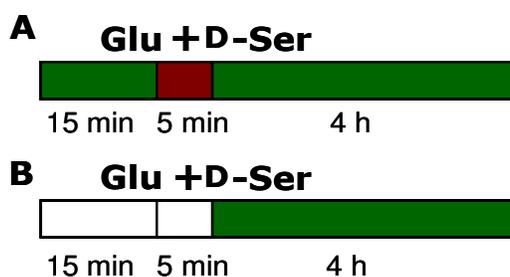
A quantificação da lesão induzida por glutamato em células neurais através da dosagem de desidrogenase láctica (LDH) extracelular é um método já bem estabelecido na literatura. Como essa enzima está presente tanto em neurônios quanto em células gliais, sua liberação poderia refletir dano a qualquer dos tipos celulares. No entanto, no modelo adotado a liberação de LDH é especificamente correlacionada com a morte neuronal (Koh e Choi, 1987). Foi descrito ainda que a LDH é liberada não somente por células necróticas como também por células apoptóticas (Lobner, 2000; Koh et al., 1995).

Primeiramente, as culturas eram lavadas duas vezes com solução salina de exposição sem  $Mg^{2+}$  (SEG – solução externa com glicose) composta de (mM): NaCl 165, KCl 5,  $CaCl_2$  2, D-glicose 30, HEPES 5, tetrodotoxina 0,0003 (Alomone Labs, Israel) e NaOH ~2 (pH 7,35). A tetrodotoxina (TTX, um bloqueador de canal de  $Na^+$ ) é adicionada à solução salina para minimizar o dano celular basal (independente de fármacos) sem afetar o dano induzido por glutamato (Ambrosini et al., 1995). Após as lavagens com salina, as células poderiam ser: 1) expostas à solução de probenecida (Sigma, EUA) nas diferentes concentrações, seguidas da solução de glutamato + D-serina, nos experimentos com exposição antes, durante e depois do insulto, ou 2) somente

ao glutamato + D-serina, nos experimentos com exposição somente pós-insulto (mais detalhes abaixo).

O insulto excitotóxico se dava pela aplicação de glutamato 500  $\mu$ M + D-serina 10  $\mu$ M por 5 min sobre as células corticais. Após 5 min de exposição, as culturas eram lavadas uma vez com MEM (sem soro), suplementado apenas com L-glutamina 1 mM, glicose 33 mM (6 g/l), bicarbonato de sódio 44 mM (3,7 g/l), para então serem levadas de volta à estufa. As células ficavam em incubação por 4 h nesse MEM sem soro, a 35 °C e 10% CO<sub>2</sub>.

A probenecida foi aplicada na cultura de duas formas, como já foi dito anteriormente: uma em que ela foi adicionada antes do insulto excitotóxico, para uma pré-exposição com duração de 15 min, permanecendo no meio durante os 5 min de exposição ao glutamato + D-serina e sendo re-adicionada após lavagem com MEM para ficar incubada durante as 4 h na cultura (experimento tempo-todo); ou somente após o pulso de glutamato + D-serina, durante as 4 h de incubação (experimento de pós-exposição).



**Figura 12.** Esquemas de tratamento nos experimentos de DIG. A) Probenecida (verde) presente durante o tempo todo (15 min + 5 min + 4 h); B) probenecida presente somente no período pós-exposição (4 h - após o insulto).

O glutamato + D-serina e a probenecida (no caso do experimento tempo-todo) eram retirados por uma lavagem com MEM sem soro. Todo o processo de exposição às soluções de teste e ao glutamato foi feito à temperatura

ambiente. As células então foram recolocadas na estufa a 35 °C e 10% CO<sub>2</sub>, em MEM sem soro por 4 h, para aguardar o processo de morte neuronal tardia. Após a incubação, alíquotas do sobrenadante das culturas eram retiradas para dosagem de LDH, como forma de quantificação bioquímica do dano celular induzido pela aplicação de glutamato + D-serina.

Em todos os experimentos, fazia-se o controle interno, incluindo um grupo em que as células eram submetidas a todas as lavagens, sem adição de probenecida e nem glutamato + D-serina, para que se pudesse subtrair o LDH basal liberado pela cultura. Por outro lado, o valor máximo da morte da cultura era obtido através da adição de glutamato + D-serina somente, sem a adição de probenecida. Dessa forma, é possível investigar a porcentagem de neuroproteção da probenecida nas concentrações escolhidas. Todos os experimentos foram realizados com três poços de cultura independentes em cada grupo de tratamento.

### **3.2.3. DOSAGEM DA ENZIMA LDH**

A LDH (EC 1.1.1.1.27) é uma enzima solúvel cuja função é catalisar a interconversão de piruvato em lactato, usando o par NADH/NAD como cofator redox (Karaguler et al., 2007). Para dosagem da enzima utilizamos os componentes do kit DHL da Doles Reagentes (Goiânia):

- Alúmen férrico: solução 0,012 M de sulfato de ferro amoniacal
- NAD: cada frasco contém 130 mg de NAD, sob forma liofilizada

- FMS: cada frasco contém, sob forma liofilizada, 4 mg de fenazina metassulfato
- Substrato: cada frasco contém 0,1M de lactato; 0,005M de o-fenantrolina em Tris 0,2M

Ao receber o kit, adicionou-se 3,5 mL de água destilada e desionizada no frasco contendo FMS. Esta solução de FMS foi então despejada no frasco contendo NAD. Agitou-se e, dessa forma obteve-se uma solução 15,82 mM de NAD e 3,73 mM de FMS.

Em um frasco âmbar separado, adicionou-se 4 mL da solução de substrato a 250 µL da solução de alumínio férrico, resultando em uma mistura de Substrato + Alumínio Férrico (SAF). No meio de reação, todos os reagentes do kit se encontram em excesso em relação à máxima quantidade de enzima presente na amostra, ou seja, o componente determinante da velocidade da reação é a enzima e não qualquer outro reagente do kit.

### **Leitura no espectrofotômetro**

O espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, EUA) era ligado aproximadamente 30 min antes da leitura, para que fosse atingida a temperatura de 37°C, temperatura ótima para a leitura da enzima LDH.

Terminadas as 4 h de incubação, recolheu-se 50 µL do sobrenadante correspondente a cada poço e transferiu-se para uma placa de 96 poços. Adicionou-se 50 µL da solução de SAF do kit e deixou-se incubando a 37°C no

leitor espectrofotométrico por 2-3 min. Acabado o tempo, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da solução de NAD + FMS do kit a cada alíquota da placa de 96 poços, resultando em u volume final de 110  $\mu\text{L}$  em cada poço.

A leitura da absorvância da reação era realizada em espectrofotômetro, a 510 nm e a 37 °C, com intervalos de 9 s, por 5 min, com um total de 34 leituras. O resultado da leitura cinética era apresentado graficamente e analisado através de um software – SoftMax Pro versão 3.0 e 4.0. A velocidade máxima de reação ( $V_{\text{máx}}$ ), em miliunidades de densidade ótica por minuto (mDO/min), era calculada a partir da curva de absorvância por regressão linear, considerando-se a maior inclinação obtida dentre segmentos sucessivos de 10 pontos da curva. Nas condições de excesso dos reagentes, a  $V_{\text{máx}}$  é proporcional à concentração da enzima LDH no sobrenadante, que por sua vez reflete o número de células lesadas na cultura (Koh e Choi, 1987).

Após a obtenção dos valores de  $V_{\text{máx}}$ , calculou-se média e desvio padrão das triplicatas de cada grupo em teste. Essas médias de liberação de LDH foram comparadas com a média de liberação de LDH induzida pelo glutamato + D-serina em cada experimento.

Averiguamos que a probenecida não interfere na atividade da enzima LDH. Isso se comprovou através da leitura da probenecida na presença de substrato, alúmen férrico e de uma solução-padrão de LDH. Viu-se, então, que ela sozinha não foi capaz de alterar a atividade cinética da enzima. A média do  $V_{\text{máx}}$  para o grupo controle (sem probenecida) foi de  $209,3 \pm 17,9$ , e a média do  $V_{\text{máx}}$  da concentração mais alta utilizada para esse experimento (20 mM) foi de  $188,9 \pm 6,8$  ( $n = 3$  em ambos). O valor de P foi de 0,44 que, segundo teste  $t$  de Student, não é considerado significativo.

A avaliação do efeito citotóxico, a fim de verificar se a probenecida sozinha é capaz de causar dano à cultura mista de células corticais, também foi feita através da dosagem de LDH. As células foram expostas à probenecida por 24 h, nas mesmas concentrações usadas para se obter a CCR, com a inclusão da concentração de 10 mM. Ao final das 24 h, recolheu-se uma alíquota de 50 µL e a leitura foi feita exatamente da mesma forma que se fez no experimento de DIG.

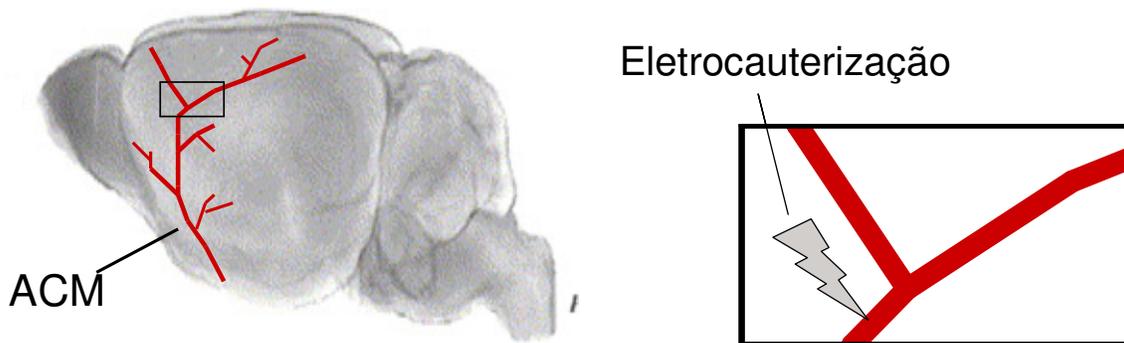
### ***3.3. OCLUSÃO PERMANENTE DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA***

O modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média (OACM) é usado em ensaios pré-clínicos de maneira a reproduzir um dos tipos mais freqüentes de AVE, assim como os eventos decorrentes deste. O método escolhido consiste em obstruir de maneira irreversível a circulação em parte da região irrigada pela artéria cerebral média, sem provocar reperfusão (Yang et al., 1998; Shichinohe et al., 2004; Bederson et al., 1986). Optamos por uma oclusão por eletrocoagulação da artéria em um ponto na região temporal, sob visualização direta. Apesar de induzir infartos menores que outros métodos que visam à oclusão da ACM na sua origem, o método escolhido tem como vantagem a baixa mortalidade dos animais operados. No modelo de oclusão intraluminal, um modelo amplamente utilizado, ocorre o aumento da pressão intracraniana, já que nesse modelo há uma maior indução da formação de edema (Xi et al., 2004).

### **3.3.1. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

Camundongos suíços machos pesando entre 35 e 40 g, com idade mínima de 2 meses, foram anestesiados por via inalatória com uma mistura de isoflurano e O<sub>2</sub> obtida com um vaporizador universal (Takaoka, BR). Primeiro os animais foram colocados numa câmara transparente onde foi feita a indução da anestesia com fluxo da mistura anestésica. Depois de verificada a perda de reflexos, os animais foram levados até a mesa operatória. A anestesia foi mantida com auxílio de uma máscara colocada no focinho do animal, onde o fluxo (0,05 a 0,2 L/min) e a dose de anestésico foram ajustados para cada animal. Durante todo o procedimento o efeito anestésico foi testado através dos reflexos palpebral e de retirada de pata (reflexo de dor na pata com auxílio de uma pinça) e observou-se o ritmo respiratório e a oxigenação (pela cor da pele). A mesa operatória foi mantida aquecida a 37° com um sistema Peltier (Cambion Instruments, EUA). Todas as cirurgias foram realizadas no lado esquerdo dos animais. Foi feita uma pequena incisão de aproximadamente 0,5 cm, com o auxílio de uma tesoura de mola entre o olho esquerdo e a orelha esquerda dos animais e o crânio foi exposto. Com uma tesoura McPherson-Vannas curva, desconectou-se o músculo temporal do crânio, e o músculo então rebatido com o auxílio de uma pinça Moloney, expondo-se assim o osso temporal. A artéria cerebral média foi localizada e realizou-se uma pequena craniectomia de aproximadamente 2 mm com auxílio de uma broca Dremel na potência mínima, para desgastar o osso. A dura mater foi retirada e a artéria cerebral média foi cauterizada com um eletrocauterizador (Medcir BM-560, BR). O músculo temporal foi recolocado em sua posição e a incisão fechada

com o auxílio de uma cola para tecidos (butilcianoacrilato, 3M). A monitoração da temperatura do animal foi realizada através da sonda retal de um termômetro analógico (Yellow Springs, EUA).



**Figura 13:** Representação do território da ACM. Figura ilustrativa mostrando a área por onde passa a ACM. Ao lado, em aumento, região da artéria onde é realizado a eletrocauterização

### 3.3.2. PÓS-OPERATÓRIO

A recuperação da anestesia ocorria em menos de 10 min e os animais eram mantidos em uma caixa aquecida com uma lâmpada de infravermelho por 1 h após a cirurgia, com comida e água *ad libitum*.

Avaliou-se o comportamento do animal por 5 min, aos 25 min após a oclusão da artéria, a fim de estabelecer o déficit neurológico decorrente do infarto obtido. Para isso, utilizou-se um escore neurológico definido pelos seguintes parâmetros (Huang et al., 1994):

0 = Função motora normal

1 = Flexão do dorso e das patas dianteiras do lado contralateral quando o animal é erguido pela cauda

2 = Animal circulando no sentido contralateral, mas com postura normal quando parado

3 = Animal apoiando-se no lado contralateral quando parado

4 = Sem atividade motora espontânea

Ficou estabelecido que o escore serviria como critério de exclusão, de modo que os animais com escore igual a zero seriam descartados da análise.

### 3.3.3. TRATAMENTOS

Visando investigar uma possível aplicação clínica, avaliamos somente os efeitos da administração intra-peritoneal (i.p.) de probenecida após a indução do AVE experimental. Apesar da probenecida ser um fármaco já usado na clínica há muitas décadas, as informações a respeito de sua farmacocinética em rato ou camundongo não foram encontradas na literatura; somente dados em humanos ou em outros animais foram encontrados no levantamento bibliográfico. Racionalizamos, então, o tratamento para os experimentos em questão, baseando-se nas meias-vidas encontradas em humanos e em outras espécies (Tabela 1).

Tabela 1. Meia-vida de eliminação da probenecida em diferentes espécies \*

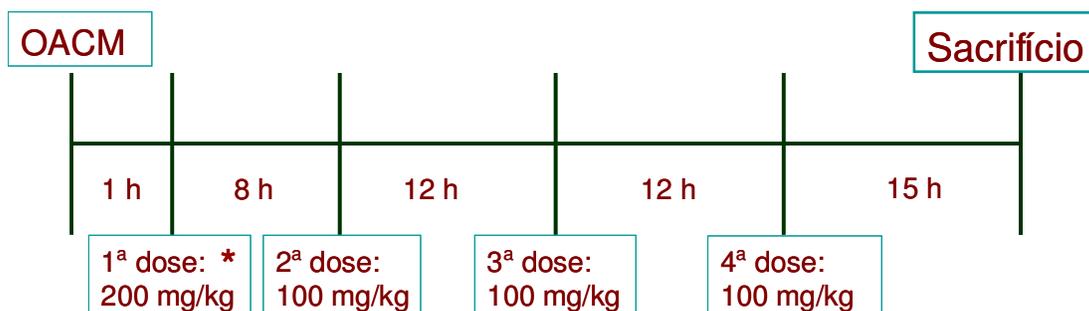
| Espécie       | Cão            | Ovelha | Homem         |
|---------------|----------------|--------|---------------|
| $t_{1/2}$ (h) | $17,7 \pm 5,7$ | 1,55   | $6,5 \pm 3,2$ |

\* (Adaptado de Kakizaki et al., 2006).

As doses foram escolhidas de acordo com os dados da literatura sobre o uso da probenecida para aumentar a concentração de AQ no SNC (Nemeth et

al., 2006; Miller et al., 1992; Vecsei et al., 1992). No primeiro experimento, o tratamento escolhido foi de apenas uma única administração de probenecida, 1 h após a eletrocauterização, na dose de 200 mg/kg i.p. A probenecida foi dissolvida em solução salina de tampão fosfato, a uma concentração de 70 mM, de modo a administrar-se 10 mL/kg. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume do veículo, também por via i.p.

No segundo experimento, o esquema de administrações foi alterado. Dessa vez, o tratamento foi realizado através de várias administrações pós-isquemia. Abaixo está esquematizado o tratamento escolhido (Figura 14):



**Figura 14:** Esquema da administração de probenecida (ou veículo) nos camundongos submetidos à OACM. \* Dose única, no 1º experimento.

### 3.3.4. CORTE DO CÉREBRO E COLORAÇÃO PELO TTC

Os animais foram anestesiados com éter (5 mL) por 2 minutos na câmara de indução e sacrificados por deslocamento cervical. Os cérebros foram retirados e colocados em uma fôrma de acrílico para cérebros de camundongo. Foram feitas, com auxílio de lâminas, as fatias de 2 mm de espessura, resultando em 6 fatias por cérebro. A última é descartada. As fatias foram lavadas uma vez com solução de tampão fosfato e em seguida a solução

de cloreto de 3-trifenil tetrazol (TTC) 0,5 % foi adicionada e as fatias eram expostas a essa solução por 30 min (15 min cada face), em uma estufa a 37°C. (Shichinohe et al., 2004; Bederson et al., 1986).

Foram obtidas imagens da face rostral das fatias utilizando-se um “scanner” de mesa comum (HP 2400) na resolução de 1800 dpi em cores. Uma escala métrica com divisões de 0,5 mm foi digitalizada junto com as fatias para calibração espacial das imagens (Figura 16). As áreas de isquemia e o contorno de cada hemisfério cerebral foram delineados manualmente como polígonos com o programa Image Pro 3.0 (Media Cybernetics, EUA). As áreas do infarto foram calculadas para cada fatia e multiplicadas pela espessura da fatia (2 mm) e somadas, sendo os resultados expressos em volume de infarto (mm<sup>3</sup>).



**Figura 15:** Face rostral da fatia do cérebro de um camundongo adulto submetido à cirurgia de OACM, corada com TTC, após 48 h após. A seta verde representa a área onde se localiza a lesão. A seta amarela representa o hemisfério ipsilateral (hemisfério esquerdo) e a seta azul representa o hemisfério contralateral (hemisfério direito). Ao lado, uma parte da régua usada para fazer a calibração (quantos mm por *pixel*; calibração feita para cada cérebro).

Não houve diferença significativa entre o volume dos hemisférios ipsilateral e contralateral, de forma que não foi necessário fazer o cálculo de correção para edema (Hata et al., 1998; Swanson et al., 1990). Foi feita somente uma correção para variações do volume cerebral entre animais, expressando-se cada medida do infarto relativa ao volume do hemisfério ipsilateral. Dessa forma, as medidas são dadas em porcentagem do infarto em relação ao hemisfério ipsilateral (Hata et al., 1998).

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A curva concentração-resposta da probenecida foi obtida através da média global de 3 experimentos feitos em triplicata, para obtenção da  $CI_{50}$ . A análise foi feita no programa Prism 4.0 (GraphPad).

No ensaio de citotoxicidade, o efeito na liberação de LDH foi avaliado por análise de variância com dois fatores (tratamento e experimento). A comparação entre o controle e os tratamentos foi feita através do teste *post-hoc* de Holm-Sidak.

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram analisados estatisticamente através do teste “t” de Student. O nível de significância foi estabelecido para  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em percentual de infarto em relação ao hemisfério ipsilateral  $\pm$  erro padrão da média (EPM) utilizando o programa SigmaPlot 9.01 (SPSS Software, EUA).

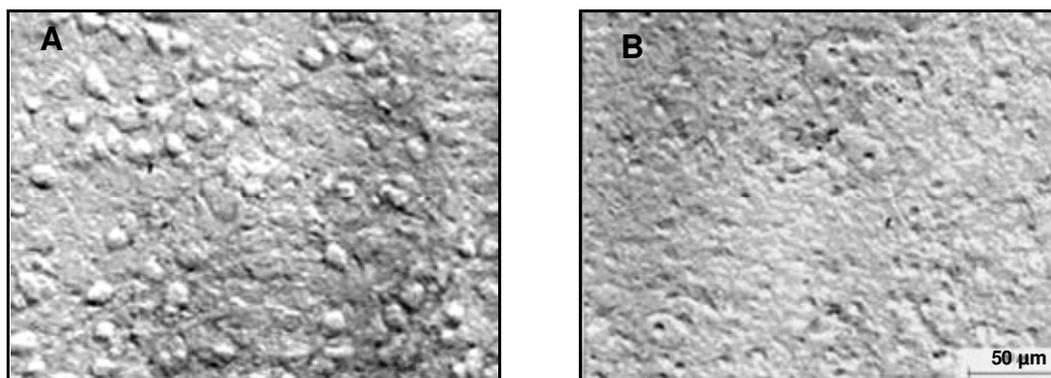
Nas fases iniciais dos experimentos *in vivo*, foi feito um cálculo para se estimar o tamanho da amostra ( $n$ ) necessário para que a diferença entre os grupos tratados e não tratados fosse significativa no teste “t” bicaudal (Zar,

1996). Nesse cálculo, estabelece-se a diferença mínima entre as médias dos grupos (porcentagem de neuroproteção que se pretende detectar -  $\delta$ ), o nível de significância ( $\alpha = 0,05$ ) e o poder do teste ( $\beta = 0,6$ ), estimando o  $n$  mínimo com base na variância medida em experimentos iniciais.

## 4. RESULTADOS

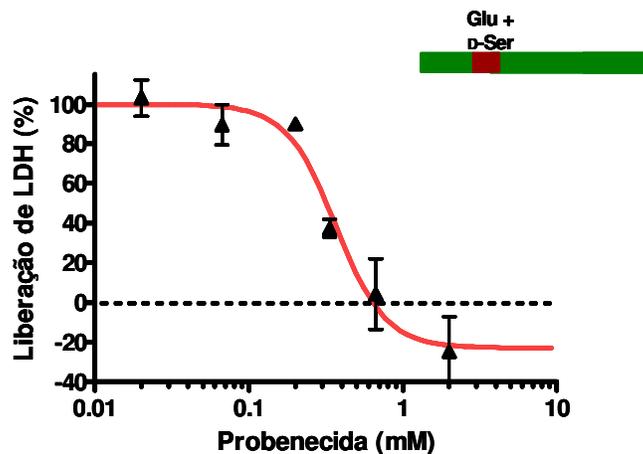
### 4.1. ENSAIOS DE NEUROPROTEÇÃO IN VITRO

O ensaio de dano induzido por glutamato já havia sido caracterizado anteriormente no Laboratório de Farmacologia Molecular na dissertação de Mestrado de Simone O. Alves (Alves, 2005). O método foi adaptado a partir dos dados obtidos por Choi em 1987, onde foi estabelecida a análise quantitativa de morte de células neurais através da dosagem da enzima LDH liberada 4 h após a indução do dano obtida com a adição de glutamato + D-serina à cultura de células.



**Figura 16:** *Imagens da cultura de neurônios corticais de culturas irmãs.* Exposição por 5 min ao glutamato causa a morte de neurônios corticais em cultura. A) Grupo controle, sujeito a todas as lavagens. B) Grupo tratado com glutamato (200  $\mu$ M) por 5 min. Os dois grupos são da mesma placa de cultura e as imagens foram feitas após 4 h de incubação em meio sem soro, em videomicroscópio invertido com contraste de Hoffman. Barra de calibração: 50  $\mu$ m.

O primeiro efeito investigado e obtido foi de acordo com o primeiro esquema apresentado na seção de Material e Métodos, em que a probenecida ficou presente o tempo todo (antes, durante e após o pulso de glutamato + D-serina). Houve efeito neuroprotetor dependente de concentração, com grande e abrupta redução da liberação de LDH em concentrações maiores que 200  $\mu\text{M}$  de probenecida (Figura 17). Na maior concentração testada (2 mM), a liberação de LDH foi menor que a basal (do grupo controle) em todos os experimentos realizados, indicando que a probenecida talvez tenha reduzido também o dano celular associado à manipulação e às trocas de meio da cultura durante o procedimento. A curva de inibição apresentou uma  $\text{CI}_{50}$  de 367  $\mu\text{M}$  e um coeficiente de Hill de 2,68.

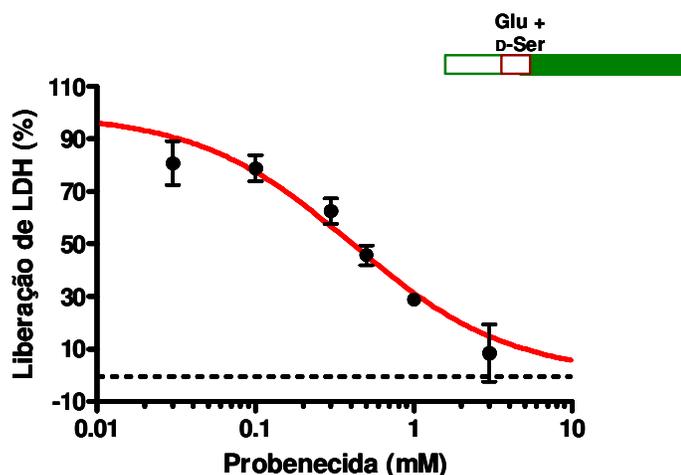


**Figura 17:** Curva concentração-resposta da probenecida sobre a neurotoxicidade do glutamato com exposição o tempo todo. Probenecida foi adicionada antes e durante o pulso de glutamato (500  $\mu\text{M}$ ) + D-serina (10  $\mu\text{M}$ ) de 5 min. Após lavagens com MEM sem soro, a probenecida foi reaplicada, permanecendo durante as 4 h de incubação em MEM. A curva de regressão corresponde a uma  $\text{CI}_{50}$  de 367  $\mu\text{M}$ , inibição máxima a -22,9% e coeficiente de Hill de 2,67. Os valores são média  $\pm$  EPM de 3 experimentos feitos em triplicata.

Tendo em vista que a probenecida apresentou efeito neuroprotetor quando presente o tempo todo no ensaio, decidiu-se investigar se esse resultado se reproduziria quando ela fosse adicionada somente após o pulso

de glutamato + D-serina. Este experimento poderia indicar se a probenecida atua somente nos mecanismos iniciadores do dano excitotóxico, ou também em mecanismos envolvidos na morte celular progressiva e retardada, que ocorre após o insulto agudo.

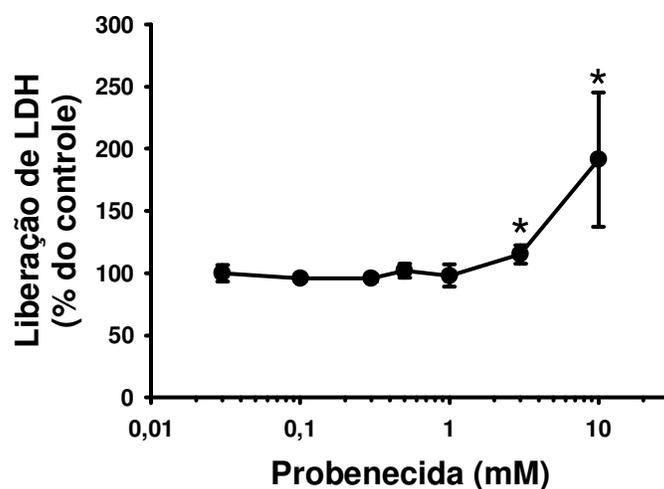
Quando aplicada por 4 h após a retirada dos agentes excitotóxicos, a probenecida ainda reduziu a liberação de LDH de forma dependente de concentração (Figura 18). O efeito teve potência semelhante, mas o incremento foi mais gradativo que no experimento de aplicação o tempo todo. A liberação de LDH não chegou a ser menor que a basal em nenhum experimento, de modo que o valor mínimo foi fixado em zero na regressão pela equação de Hill. A curva de inibição pós-insulto apresentou uma  $CI_{50}$  de 410  $\mu$ M e um coeficiente de Hill de 0,87.



**Figura 18:** Curva concentração-resposta da probenecida sobre a neurotoxicidade do glutamato com exposição pós-insulto. Probenecida foi adicionada após lavagens com MEM sem soro, seguidas do pulso de glutamato (500  $\mu$ M) + D-serina (10  $\mu$ M) de 5 min, permanecendo durante as 4 h de incubação em MEM. A Curva de regressão corresponde a uma  $CI_{50}$  de 410  $\mu$ M e um coeficiente de Hill de 0,87. A inibição máxima foi fixada a zero. Os valores são média  $\pm$  EPM de 2 ou 3 experimentos feitos em triplicata.

#### 4.1.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA PROBENECIDA

Nas maiores concentrações testadas, o efeito da probenecida apresentou uma maior variabilidade entre replicações e entre culturas independentes. Considerando evidências na literatura de efeitos tóxicos da probenecida em alguns tipos celulares, avaliou-se então sua citotoxicidade quando exposta à cultura mista de células corticais por um tempo prolongado. Não se observou qualquer alteração da liberação de LDH em concentrações até 1 mM de probenecida, quando aplicada por 24 h (Figura 19). Nas concentrações de 3 e 10 mM houve aumento significativo da liberação de LDH, indicando um efeito tóxico nas células neurais.



**Figura 19:** Citotoxicidade da probenecida em cultura de células corticais. Probenecida foi adicionada aos poços, permanecendo durante 24 h. Os valores são média  $\pm$  EPM de 3 experimentos feitos em triplicata. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle, ANOVA de 2 fatores e teste de Holm-Sidak.

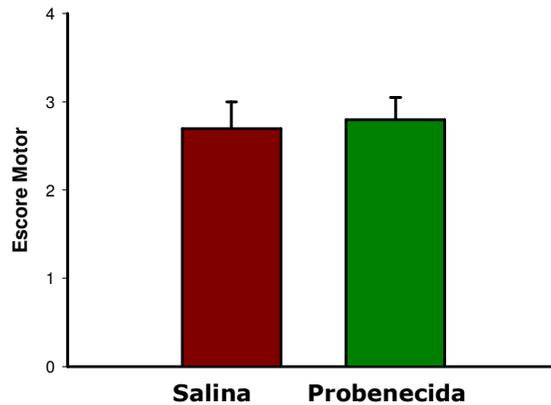
## **4.2 ENSAIOS DE NEUROPROTEÇÃO IN VIVO**

Depois de verificado o efeito neuroprotetor da probenecida na cultura mista de células corticais, restava investigar se esse efeito se reproduziria *in vivo*. No primeiro experimento, foi avaliado o efeito de uma dose única i.p. de 200 mg/kg, administrada 1 h após o procedimento de isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.

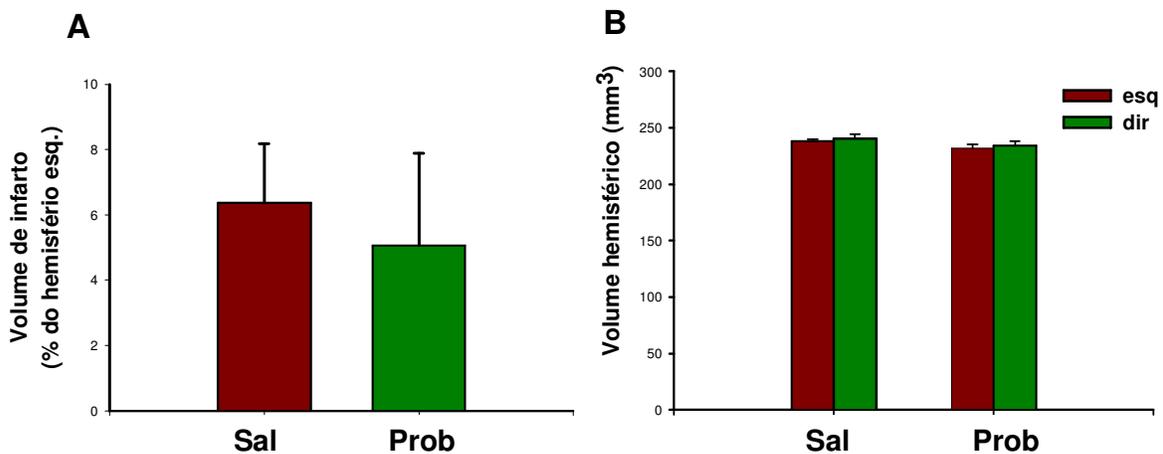
Após obtermos uma amostra de 10 animais em cada grupo, constatamos que no grupo tratado parecia haver uma tendência à redução do volume de infarto, mas esta estava mascarada por uma grande variação intra-grupo. Três animais do grupo controle e dois tratados não apresentaram isquemia detectável pelo TTC e foram excluídos da análise. Em todos os animais submetidos à cirurgia foi avaliado o escore neurológico, a fim de confirmar que o infarto ocorreu e, assim sendo, acarretou em um déficit motor (Hata et al., 1998; Huang et al., 1994). Todos os animais apresentaram assimetria na flexão do dorso e na direção da marcha, obtendo escores entre 2 e 3. Somente 2 animais em cada grupo obtiveram escore 4 e nenhum foi excluído por ter escore zero. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado (Figura 20).

O volume de infarto foi de  $6,36 \pm 1,81\%$  ( $n = 7$ ) no grupo controle e de  $5,05 \pm 2,83\%$  ( $n = 8$ ) no grupo tratado, refletindo 21% de redução relativa (Figura 21A). A diferença entre os grupos não foi significativa ( $P = 0,915$ ). Não houve diferenças de volume entre o hemisfério lesado e o contralateral, indicando ausência de edema tanto no grupo tratado quanto no controle (Figura 21B).

Apesar de nenhum animal ter sido excluído pelo critério do escore neurológico, 4 animais morreram durante essa etapa, sendo que uma destas mortes ocorreu horas após o término da cirurgia. Além disso, alguns animais foram excluídos da análise ou por ter produzido um infarto não detectável pelo TTC (conforme explicado acima), ou porque alguma fatia foi arruinada ao longo da etapa de coloração.



**Figura 20:** *Escore neurológico dos animais submetidos à OACM e tratados 1 h após a cirurgia.* Avaliação motora realizada 15 min após a cirurgia de isquemia focal permanente. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os valores são média ± EPM (n = 7 para o grupo controle e 8 para o grupo tratado).

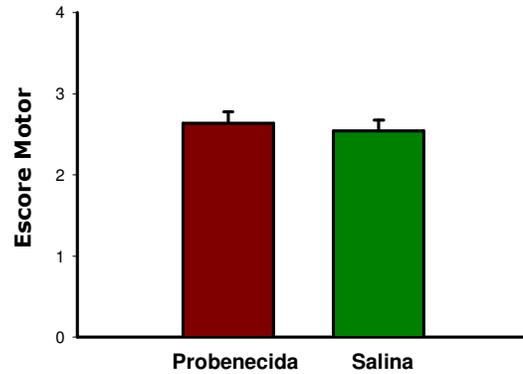


**Figura 21:** *Efeito da probenecida no infarto por eletrocauterização da artéria cerebral média* Probenecida na concentração de 200 mg/kg administrada via i.p., 1 h após a cirurgia de isquemia focal permanente em camundongos. (A) Os valores são média da razão entre o volume de infarto e o volume do hemisfério ipsilateral ± EPM (n = 7 para o grupo controle e 8 para o grupo tratado). (B) Comparação dos volumes dos hemisférios direito e esquerdo. Não houve formação de edema. Os valores são média ± EPM dos volumes dos hemisférios dos animais tratados com múltiplas administrações. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Após análise do resultado da administração de probenecida 1 h pós-OACM, foi feito o cálculo para estimar o  $n$  necessário para que a diferença entre os grupos fosse significativa, assumindo que a diferença entre as médias populacionais fosse a mesma observada nas amostras de 7-8 animais (1,31 mm<sup>3</sup>). O  $n$  necessário no experimento seria de 131 animais para cada grupo. Consideramos que não seria razoável continuar este experimento, então passamos ao segundo experimento, com um esquema de várias administrações de probenecida (vide figura 14), na expectativa que a magnitude do efeito fosse maior, exigindo um menor número de animais. A análise preliminar do tamanho amostral, com 10 animais em cada grupo, indicou um efeito maior que no experimento de dose única, estimando-se um  $n$  mínimo de 18 animais por grupo para atingir significância.

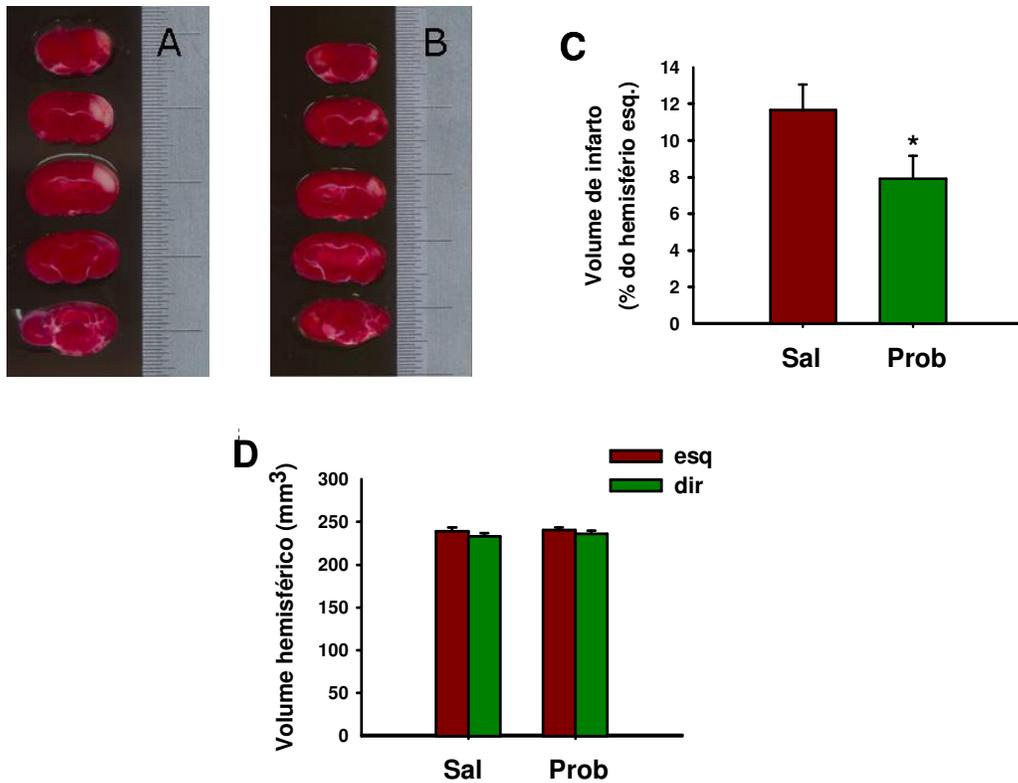
O resultado do tratamento com múltiplas administrações de probenecida está apresentado nas Figuras 22 e 23. Nessa etapa, apenas 3 animais morreram durante a cirurgia. A diminuição do número de animais perdidos deve estar relacionada com o aprimoramento da técnica.

Assim como nos animais onde foi administrada probenecida 1 h após OACM, também foi avaliado o escore neurológico, a fim de confirmar o déficit motor causado pela cauterização da artéria cerebral média (Figura 22). Os escores médios foram  $2,64 \pm 0,14$  e  $2,55 \pm 0,13$  nos grupos controle e tratado, respectivamente. Somente 4 animais obtiveram escore 4 e nenhum foi excluído com escore zero.



**Figura 22:** *Score neurológico dos animais submetidos à OACM e tratados com múltiplas doses após a cirurgia. Avaliação motora realizada 15 min após a cirurgia de isquemia focal permanente. Não houve diferença significativa entre os grupos (n = 22 em cada).*

O volume de infarto foi de  $11,7 \pm 1,4\%$ , no grupo controle e de  $7,9 \pm 1,2\%$  (n = 22 para cada grupo) no grupo tratado com múltiplas doses (Figura 23A), ou seja, uma redução relativa de 32% entre os grupos tratados e não-tratados. A diferença entre os grupos foi significativa ( $P = 0,049$ ). Neste experimento também não houve diferenças de volume entre o hemisfério lesado e o contralateral, indicando ausência de edema em ambos os grupos (Figura 23B).



**Figura 22:** Efeito da probenecida no infarto por eletrocauterização da artéria cerebral média. Probenecida na concentração de 200 mg/kg administrada via i.p., 1 h após a cirurgia e na concentração de 100 mg/kg 9, 21 e 33 h após a cirurgia de isquemia focal permanente em camundongos. (A) Fatias representativa da média de animais tratados com salina i.p. ; (B) Fatias representativas da média de animais tratados com múltiplas doses de probenecida pós-OACM. As fatias são escaneadas com a régua pois a cada fatia se fazia a calibração; (C) Os valores são: média da razão entre o volume de infarto e o volume do hemisfério ipsilateral  $\pm$  EPM, com  $n = 22$  para ambos os grupos. \*  $P < 0,05$  segundo teste t de Student. (D) Comparação dos volumes dos hemisférios direito e esquerdo. Não houve formação de edema. Os valores são média  $\pm$  EPM dos volumes dos hemisférios dos animais tratados com múltiplas administrações. Não houve diferença significativa entre os grupos.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o objetivo foi investigar o efeito neuroprotetor da probenecida, não só *in vitro* como *in vivo*. O primeiro passo foi verificar se ela é capaz de reduzir o dano induzido por glutamato (DIG), sendo este um pivô no espalhamento do dano causado após injúria isquêmica. Verificamos então que ela foi capaz de reduzir a zero o DIG em culturas de células corticais, tanto quando adicionada antes do insulto como quando adicionada após insulto, com  $CI_{50}$  de 0,37 e 0,41 mM, respectivamente. Até onde pudemos apurar, este é o primeiro estudo a mostrar um efeito protetor direto da probenecida em células neurais. No passo seguinte verificamos que esse efeito poderia ser extrapolado para modelo de AVE *in vivo*.

A proteção obtida pela probenecida em cultura é equiparável à proteção pela adição de antagonistas do receptor NMDA, (por exemplo MK-801 (Molz et al., 2008)) que, quando adicionados antes do insulto de glutamato, são tidos como padrões de máximo de neuroproteção atingível. Já foi avaliado anteriormente em nosso laboratório o efeito do MK-801 no DIG, aplicado somente antes do DIG e somente depois. Quando se faz uma pré-aplicação de MK-801, ele é capaz de proteger totalmente as células, levando os valores de liberação de LDH iguais ao controle. Porém, quando ele é aplicado somente após, ele oferece proteção máxima parcial (Alves, 2005). Esse comportamento se reflete na maioria dos agentes já testados. Além da comprovação do efeito neuroprotetor quando aplicada *in vitro*, esse experimento também fornece a informação de que o efeito nas culturas de córtex indica que neurônios e/ou células de glia também podem ser alvos diretos do efeito neuroprotetor da

probenecida *in vivo*, além de efeitos indiretos em transporte epitelial no cérebro ou em outros órgãos, como, por exemplo, sua ação nos transportadores presentes nas células da barreira hemato-encefálica.

Dentre os modelos utilizados para o estudo do perfil neuroprotetor *in vivo* de novos compostos, o modelo de isquemia focal permanente que utilizamos é bastante utilizado em ensaios pré-clínicos. Este modelo se baseia em produzir um infarto cerebral mais comum, ocasionado pela oclusão da ACM. O padrão de efeito positivo previamente utilizado para a validação do modelo experimental no laboratório foi a cetamina, que é um antagonista não competitivo dos receptores de NMDA, capaz de bloquear esses canais e inibir o fenômeno de excitotoxicidade que ocorre após o dano isquêmico (Werner et al., 1997). A cetamina foi capaz de inibir em 56% a isquemia focal permanente nos animais de experimentação (Tributino, 2008)

Modelos experimentais de AVE geralmente são realizados em animais anestesiados, mas muitos dos anestésicos comumente utilizados apresentam um grau de neuroproteção significativo (Koerner e Brambrink, 2006), como visto com a cetamina. Assim, a escolha do anestésico ideal para o modelo é de suma importância em ensaios pré-clínicos para substâncias neuroprotetoras. Em nosso modelo, utilizamos o anestésico isoflurano. Não há muita diferença na neuroproteção provida por agentes anestésicos quando se faz uma avaliação de curto prazo. O que se sabe é que a neuroproteção causada pelo isoflurano em fatias de hipocampo de rato submetidas à privação de glicose e O<sub>2</sub> depende da idade dos animais e desaparece em animais maduros (Zhan et al., 2006). A indução e o despertar da anestesia rápidos indicam que

provavelmente o isoflurano não interferiu com o efeito da probenecida, que foi administrada a partir de 1 h após o procedimento cirúrgico.

Já se conhecia um trabalho publicado por Nozaki e Beal (1992) no qual foi comprovada a capacidade de diminuir o volume do infarto tecidual em modelo de hipóxia neonatal. Porém, nesse trabalho, a administração da probenecida foi antes do insulto isquêmico, o que tem significado discutível quando se considera o possível uso terapêutico no AVE. Além disso, os autores não levaram em consideração esse efeito na discussão do trabalho, já que o seu objetivo era investigar o efeito neuroprotetor do aumento da concentração de L-quinurenina no SNC. Nosso estudo foi delineado visando o pós-tratamento, por sua importância clínica, e demonstrou que o efeito protetor da probenecida se manteve mesmo com ela sendo administrada após insulto e em animais adultos.

A probenecida, no modelo utilizado, foi capaz de reduzir em 32% a lesão cerebral isquêmica, quando administrada em múltiplas doses, durante 48 h. Este fármaco apresenta diversas propriedades que podem ter contribuído para tal efeito. O primeiro consiste na sua capacidade de aumentar os níveis de AQ no SNC, como já foi descrito na introdução deste trabalho, através do bloqueio competitivo de transportadores presentes no epitélio da barreira hematoencefálica. Em altas concentrações, o AQ é capaz de antagonizar receptores excitatórios, tanto do subtipo NMDA quanto AMPA. Em concentrações mais baixas (mais próximas ao fisiológico – em torno de 7,9  $\mu\text{M}$ ), o AQ é consideravelmente seletivo para o sítio da glicina/D-serina do receptor NMDA. Além disso, foi recentemente proposto que o AQ atua ainda como um bloqueador não-competitivo em receptores nicotínicos  $\alpha 7$  (Mok et al., 2009;

Hilmas et al., 2001). Rosza e colaboradores mostraram ainda que o AQ em concentrações micromolares exerce efeito neuroinibitório enquanto que em concentrações nanomolares, funciona como facilitador na neurotransmissão hipocampal em ratos, um efeito paradoxal que deve ser levado em consideração (Rozsa et al., 2008). Transportadores de AQ estão presentes em células gliais e em neurônios (Dallas et al., 2003; Hirrlinger et al., 2002) e podem ser alvo da probenecida, Estas interações podem ser relevantes para os efeitos neuroprotetores observados na cultura de córtex e também *in vivo*, junto com o possível efeito nos transportadores presentes na membrana epitelial da barreira hemato-encefálica.

Outro alvo de estudo da neuroproteção que já vem sendo pesquisado há algumas décadas é a manipulação dos níveis celulares de nucleotídeos cíclicos como moduladores do dano gerado após insulto isquêmico. A manipulação farmacológica dos níveis de nucleotídeos cíclicos é um ponto controverso, onde ainda não se pôde afirmar se o aumento intracelular desses mediadores seria um fator benéfico ou não.

O óxido nítrico liberado após insulto isquêmico ativa a guanilato ciclase solúvel e aumenta a concentração de GMPc. A ativação de receptores ionotrópicos, tais como receptor NMDA, leva à ativação de óxido nítrico sintase, aumenta formação de óxido nítrico, levando ao aumento dos níveis de GMPc. Níveis de GMPc em fatias de cerebelo de ratos adultos foram reduzidos significativamente pelo bloqueio dos receptor NMDA. No entanto, o papel do GMPc na mediação de glutamato neurotoxicidade permanece não determinada (Montoliu et al., 1999; Southam et al., 1991). Alguns autores indicam que o GMPc desempenha um papel no sentido de diminuir morte neuronal, como por

exemplo Garthwaite e Garthwaite, em 1988. Entretanto, outros autores sugerem que GMPc poderia ter um efeito neurotóxico, como é o caso do grupo de Carmina Montoliu, que trabalha com a hipótese de que o aumento do GMPc, através da inibição de guanilato ciclase, aumenta lesão induzida por glutamato (Montoliu et al., 1999). Também já foi demonstrado que o GMPc e seus produtos de degradação extracelular têm efeito neuroprotetor (Molz et al., 2005).

Já em relação ao AMPc, existem evidências de que seus níveis sofrem uma queda após um insulto isquêmico (Pourcyrous et al., 1999). Em relação a seu efeito em isquemia, sabe-se que o AMPc reverte vasoespasmo induzido por infarto em vasos centrais (Palmer, 1985). Já na lesão induzida por glutamato, há evidências de que sua elevação possui efeito no sentido de diminuí-la (Hampson e Grimaldi, 2001). Também já foi estudado que elevações nos níveis de AMPc são capazes de reestabelecer atividade elétrica após isquemia global transiente (Toung et al., 1996).

Estudos anteriores em nosso laboratório revelaram efeito neuroprotetor com aumento da produção de AMPc por forskolina (FK), enquanto que o estímulo à produção de GMPc com *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (SNAP), um doador NO, aumentou o dano induzido por glutamato (DIG) em concentrações intermediárias (30  $\mu$ M) e reduziu o DIG a 300-1000  $\mu$ M (Alves, 2005). O isobutil 1-metil-xantina (IBMX), um inibidor de PDE não seletivo, e outros antagonistas seletivos de PDE também reduziram o DIG.

Descrito inicialmente há mais de 40 anos em eritrócitos de aves (Davoren e Sutherland, 1963), a existência de um transporte de efluxo de AMPc é bem conhecida nos túbulos renais. O AMPc é excretado através da

membrana apical do túbulo proximal até a urina. Essa rota de efluxo de AMPc é dependente de ATP e é inibida pela probenecida. Hoje é sabido que tanto o efluxo de AMPc quanto de GMPc é sensível à probenecida (Hepp et al., 2007), e, por essa razão, esse é mais um efeito pelo qual ela é amplamente usada como ferramenta farmacológica.

Os mecanismos à jusante do aumento de AMPc e GMPc que culminam com o efeito neuroprotetor ainda não foram esclarecidos. A probenecida poderia exercer efeito neuroprotetor devido à sua capacidade de alterar os níveis de nucleotídeos cíclicos, pois o bloqueio do efluxo de AMPc e GMPc da célula aumenta seus níveis intracelulares. Essa hipótese surgiu a partir de estudos onde se mostrou que o transporte de GMPc e AMPc é sensível à probenecida (Schultz et al., 1998; Gogel et al., 1983; Henderson e Strauss, 1991; Tjornhammar et al., 1983). Cada vez mais evidências indicam que as flutuações rápidas nos níveis em nucleotídeos cíclicos durante o curso primário e secundário do AVE são mais do que epifenômenos da doença. Durante a fase aguda da isquemia, anóxia ou hipóxia, o AMPc rapidamente se acumula no tecido cerebral, no líquido cefalorraquidiano e no plasma venoso, enquanto GMPc permanece inalterado ou diminui. Presumivelmente, a causa da lesão aos sistemas membranares resulta do acúmulo de ácido láctico e/ou entrada de  $Ca^{2+}$  através da barreira hemato-encefálica danificada. Além disso, o AMPc é capaz de reverter infarto induzido por vasoespasmos em vasos centrais (Palmer, 1985). Os mecanismos envolvidos na possível neuroproteção pelo aumento de nucleotídeos cíclicos estão relacionados com a ativação de enzimas por segundos-mensageiros celulares, tais como PKA e PKC, gerando uma diversidade de efeitos intracelulares, mas o principal efeito ao qual se

atribui a neuroproteção dos nucleotídeos cíclicos seria a diminuição da apoptose (Silveira e Linden, 2006; Forloni et al., 1997). Além disso, deve-se considerar a possibilidade de os nucleotídeos agirem em alvos extracelulares. Por exemplo, a adenosina, produzida por degradação do AMPc, poderia agir em seus receptores de membrana.

Durante e após isquemia, ocorrem mudanças na homeostase ácido-base. Mecanismos transmembranares que contribuem para regulação ácido-base intracelular (trocas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  e co-transporte lactato/ $\text{H}^+$ ) são marcadamente ativados durante a isquemia. A eficácia destes mecanismos é abolida à medida que a permeabilidade da membrana celular aos íons aumenta subitamente com a despolarização, incluindo mudanças aniônicas decorrentes da entrada de  $\text{H}^+$  e da mudança de pH. O efluxo de lactato intracelular durante a isquemia e sua recaptção devida à reperfusão ocorrem principalmente por meio de um transportador (Taylor et al., 1996). Acúmulo de lactato tem sido implicado na evolução da lesão cerebral após isquemia, já que a compartimentação de lactato pode desempenhar um papel no equilíbrio ácido-base. A taxa de liberação de lactato aumenta 3,2 vezes em anóxia, enquanto que é reduzida em 50 e 25% durante a isquemia e aglicemia (Assaf et al., 1990). Acidose exacerbada pode potencializar o dano isquêmico por um dos três mecanismos: (i) acelerando a produção de radicais livres através de reações dependentes de  $\text{H}^+$ , alguns dos quais são catalisadas por ferro liberado da ligação à proteína por uma redução do pH, (ii) perturbando a via de transdução de sinais intracelulares, levando a alterações na expressão gênica ou na síntese protéica, ou (iii) ativando endonucleases que provocam a fragmentação do DNA (Siesjo et al., 1996).

O lactato é um ânion orgânico e, por sua vez, seu transporte é sensível à inibição por probenecida (Cruz et al., 2007; Korf, 1996). Como o receptor NMDA é inibido por acidose extracelular, as elevações dos níveis de lactato poderiam diminuir a excitotoxicidade. Além disso, o cérebro adquire preferência pelo lactato como substrato energético após insulto isquêmico, quando já se encontra novamente em estado de metabolismo aeróbico. Recentemente, foi mostrado que o lactato foi capaz de diminuir dano induzido por hipóxia em cultura organotípica hipocampal, sendo adicionado imediatamente após insulto. *In vivo*, após OACM em ratos, uma injeção intracerebroventricular de lactato, imediatamente após a reperfusão, levou a uma diminuição significativa no tamanho da lesão (Berthet et al., 2009). Por outro lado, nesse mesmo trabalho, foi verificado que o lactato, em concentrações mais elevadas, produziu efeito tóxico, na mesma cultura organotípica hipocampal. Já foi mostrado que o bloqueio do transporte de lactato em neurônios aumentando, assim, os níveis de lactato extracelular, é capaz de aumentar o dano neuronal tardio em modelo de isquemia cerebral em ratos (Schurr et al., 2001). Portanto, o aumento dos níveis de lactato decorrentes da adição de probenecida, poderia contribuir tanto para seu efeito neuroprotetor quanto para seu efeito citotóxico.

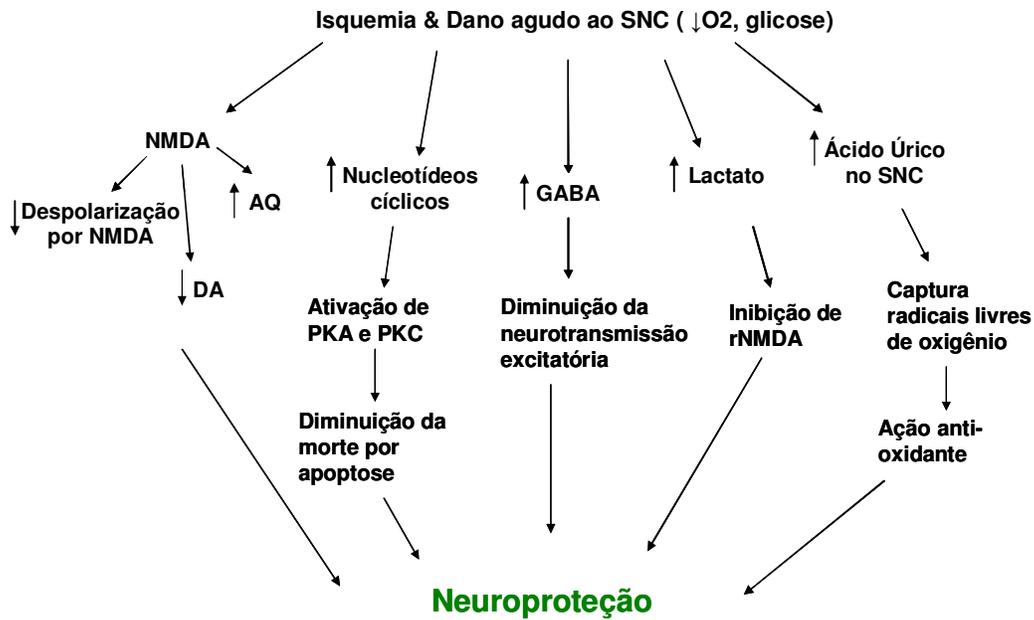
Outro fenômeno que participa da fisiopatologia do AVE é a depressão alastrante na região peri-infarto. Tais despolarizações são iniciadas no núcleo do infarto até a zona periférica. Durante a depressão alastrante, a taxa metabólica do tecido aumenta significativamente em resposta à grande demanda de energia pelas bombas de troca iônica dependentes de ATP. Como resultado, agrega-se o aumento da carga metabólica à baixa oferta de oxigênio, conduzindo a episódios de hipóxia transitória e ao aumento

progressivo do lactato durante a passagem de cada despolarização (Norris et al., 1998). Essa correlação sugere que, durante as 3 h iniciais de oclusão vascular, cada despolarização aumenta o volume do infarto por mais de 20%. Esta é provavelmente uma das razões pelas quais antagonistas do glutamato são capazes de reduzir o volume de infarto cerebral, já que essas substâncias são potentes inibidores da depressão alastrante (Iijima et al., 1992). Como foi mostrado por Taylor e colaboradores, a probenecida é capaz de inibir a depressão alastrante induzida por íons  $K^+$ , além de, em concentrações mais altas (20 mM), ser capaz de diminuir significativamente a despolarização induzida pela adição de NMDA (Taylor et al., 1997). Pela grande proteção observada nos ensaios *in vitro* realizados neste trabalho, é possível pensar que a probenecida possa ter um efeito inibidor direto no receptor NMDA. Esta possibilidade merece investigações futuras.

Agonistas e derivados do GABA também têm sido foco de estudos em neuroproteção (Schwartz-Bloom et al., 2000). Inclusive, o diazepam, um potencializador GABAérgico, já foi objeto de ensaios pré-clínicos (Aerden et al., 2004) e clínicos para AVE (Lodder et al., 2006). O papel do GABA na cascata de neuroproteção seria o de diminuir a neurotransmissão excitatória, já que o receptor  $GABA_A$  é um canal permeável à entrada de íons cloreto. O GABA também é liberado quando há despolarização da membrana após AVE (Ginsberg, 2008). Kakee e colaboradores mostraram que a administração sistêmica de probenecida é capaz de elevar os níveis de GABA no SNC (Kakee et al., 2001). Portanto, o aumento da concentração do GABA pode ser mais um mecanismo que contribuiu para o efeito neuroprotetor da probenecida nos nossos experimentos.

Recentemente, alguns estudos têm apontado o ácido úrico como um potencial neuroprotetor (Yu et al., 1998). O ácido úrico é um anti-oxidante natural, e está presente no plasma em concentrações relativamente altas ( $302 \pm 60 \mu\text{M}$  em homens e  $234 \pm 52 \mu\text{M}$  em mulheres). Seu efeito anti-oxidante é atribuído à sua capacidade de capturar peroxinitrito, radicais hidroxila e oxigênio singlete, e de quelar metais de transição (Seet et al., 2009). O peroxinitrito é um potente oxidante que é formado pela combinação rápida de NO com superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), sendo formado em uma resposta inflamatória (Hooper et al., 1998), Sabe-se que após insulto isquêmico, a oxidação tecidual também é responsável pelo espalhamento da lesão. Por isso, muitos agentes anti-oxidantes são estudados em modelos de isquemia. A probenecida é capaz de alterar os níveis plasmáticos de ácido úrico e, talvez, pode ser capaz de aumentar seus níveis dentro do SNC, o que lhe atribuiria um efeito anti-oxidante indireto.

No esquema da Figura 25, apresentam-se, resumidamente, os possíveis alvos pelo qual a probenecida exerce seu efeito neuroprotetor.



**Figura 25:** Vias envolvidas no efeito protetor da probenecida, após isquemia. DA: depressão alastrante, AQ: ácido quinurênico

Até o momento em que os pacientes com AVE chegam ao hospital, eles têm uma parcela do tecido passível de salvamento limitada: 70% do volume do infarto potencial podem estar irremediavelmente danificados, 18% podem ser viáveis, mas com baixa perfusão, e 12% podem ser de tecido saudável, mas que está fadado a ser mais uma região infartada, possivelmente devido ao alastramento do processo excitotóxico (Lees, 2000). A importância da busca de medicamentos que auxiliem no tratamento do AVE é indiscutível, não só por se tratar de uma doença que é uma das maiores causadoras de morte no mundo todo, mas também por ser responsável pela debilitação e hospitalização de pacientes que não chegam a atingir óbito, sendo assim extremamente dispendiosa. Não existe atualmente nenhum fármaco neuroprotetor aprovado para uso clínico, mas considerável otimismo persiste. Diversos estudos clínicos de grande porte vêm sendo concluídos recentemente ou estão em andamento.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A probenecida foi capaz de diminuir o volume do infarto mesmo tendo sido administrada 1 h após indução da lesão. Os ensaios baseados na administração de agentes neuroprotetores antes ou simultaneamente à lesão são reconhecidamente uma grande fonte de falhas quando os potenciais novos fármacos evoluem da fase pré-clínica para a fase clínica. O efeito benéfico observado com a administração pós-infarto da probenecida pode encorajar novos estudos com latências maiores até a primeira dose em animais e eventualmente estudos clínicos. O fato de a probenecida já ser um fármaco comercializado há muitas décadas é uma grande vantagem, pois já se tem vasto conhecimento acerca de seus efeitos adversos e suas limitações clínicas, que são bem baixas, já que é um medicamento bem tolerado pela grande maioria dos pacientes.

O efeito direto em cultura de neurônios, independente de epitélios, suscita novas hipóteses do mecanismo neuroprotetor da probenecida. Por exemplo, caberá investigar a dependência do transporte de nucleotídeos cíclicos, manipulando-se tanto a síntese de AMPc e GMPc quanto a sua degradação, inibindo-se fosfodiesterases especificamente, ou a dependência do transporte neuronal e glial do AQ e da modulação do receptor NMDA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERDEN, L.A., KESSELS, F.A., RUTTEN, B.P., LODDER, J., e STEINBUSCH, H.W. Diazepam reduces brain lesion size in a photothrombotic model of focal ischemia in rats. **Neurosci. Lett.**, vol. 367, p. 76-78, 2004.
- ALVES, S.O. **Estudo Farmacológico de Mecanismos de Neuroproteção *in Vitro***. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- AMBROSINI, A., BRESCIANI, L., FRACCHIA, S., BRUNELLO, N., e RACAGNI, G. Metabotropic glutamate receptors negatively coupled to adenylate cyclase inhibit N-methyl-D-aspartate receptor activity and prevent neurotoxicity in mesencephalic neurons in vitro. **Mol. Pharmacol.**, vol. 47, p. 1057-1064, 1995.
- ANKARCRONA, M., DYPBUKT, J.M., BONFOCO, E., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., LIPTON, S.A., e NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, vol. 15, p. 961-973, 1995.
- ASHMAN, D.F., LIPTON, R., MELICOW, M.M., e PRICE, T.D. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 11, p. 330-334, 1963.
- ASHWAL, S. e PEARCE, W.J. Animal models of neonatal stroke. **Curr. Opin. Pediatr.**, vol. 13, p. 506-516, 2001.
- ASSAF, H.M., RICCI, A.J., WHITTINGHAM, T.S., LAMANNA, J.C., RATCHESON, R.A., e LUST, W.D. Lactate compartmentation in hippocampal slices: evidence for a transporter. **Metab Brain Dis.**, vol. 5, p. 143-154, 1990.
- ASTRUP, J., SIESJO, B.K., e SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. **Stroke**, vol. 12, p. 723-725, 1981.
- BALLERINI, P., DI, I.P., CICCARELLI, R., NARGI, E., D'ALIMONTE, I., TRAVERSA, U., RATHBONE, M.P., e CACIAGLI, F. Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. **Neuroreport**, vol. 13, p. 1789-1792, 2002.
- BEDERSON, J.B., PITTS, L.H., TSUJI, M., NISHIMURA, M.C., DAVIS, R.L., e BARTKOWSKI, H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, vol. 17, p. 472-476, 1986.
- BELAYEV, L., BUSTO, R., ZHAO, W., e GINSBERG, M.D. HU-211, a novel noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist, improves neurological

- deficit and reduces infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in the rat. **Stroke**, vol. 26, p. 2313-2319, 1995.
- BERTHET, C., LEI, H., THEVENET, J., GRUETTER, R., MAGISTRETTI, P.J., e HIRT, L. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 29, p. 1780-1789, 2009.
- BEYER, K.H., RUSSO, H.F., TILLSON, E.K., MILLER, A.K., VERWEY, W.F., e GASS, S.R. 'Benemid,' p-(di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid; its renal affinity and its elimination. **Am. J. Physiol.**, vol. 166, p. 625-640, 1951.
- BLANC, E.M., BRUCE-KELLER, A.J., e MATTSON, M.P. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. **J. Neurochem.**, vol. 70, p. 958-970, 1998.
- BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCORONA, M., NICOTERA, P., e LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, vol. 92, p. 7162-7166, 1995.
- BRUST, J.C.M. Cerebral Circulation: Stroke. In: **Principles of Neural Science**. 4<sup>a</sup> ed., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., e Jessell, J.M. Elsevier, New York, p. 1302-1316, 2000.
- BURKE, M.A. e ARDEHALI, H. Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. **Transl. Res.**, vol. 150, p. 73-80, 2007.
- CHEN, Z.S., LEE, K., e KRUH, G.D. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. **J. Biol. Chem.**, vol. 276, p. 33747-33754, 2001.
- CHOI, D.W., MAULUCCI-GEDDE, M., e KRIEGSTEIN, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J. Neurosci.**, vol. 7, p. 357-368, 1987.
- CHOI, T.L. e KIM, Y.K. Effect of probenecid on tetraethyl ammonium (TEA) transport across basolateral membrane of rabbit proximal tubule. **Korean J. Intern. Med.**, vol. 7, p. 130-136, 1992.
- CHUNG, S.H., KIM, M.J., LEE, J.Y., e CHUNG, J.H. Effects of probenecid on platelet aggregation and cytotoxicity: drawbacks of the use of probenecid in monitoring intracellular calcium metabolism. **Thromb. Res.**, vol. 85, p. 345-350, 1997.
- CRUZ, N.F., BALL, K.K., e DIENEL, G.A. Functional imaging of focal brain activation in conscious rats: impact of [(14)C]glucose metabolite spreading and release. **J. Neurosci. Res.**, vol. 85, p. 3254-3266, 2007.
- CULL-CANDY, S.G. e LESZKIEWICZ, D.N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Sci. STKE.**, vol. 2004, p. re16, 2004.

- CUNNINGHAM, S. The epidemiologic basis of coronary disease prevention. **Nurs. Clin. North Am.**, vol. 27, p. 153-170, 1992.
- CZEPITA, D., DAW, N.W., e REID, S.N. Glycine at the NMDA receptor in cat visual cortex: saturation and changes with age. **J. Neurophysiol.**, vol. 75, p. 311-317, 1996.
- DALLAS, S., ZHU, X., BARUCHEL, S., SCHLICHTER, L., e BENDAYAN, R. Functional expression of the multidrug resistance protein 1 in microglia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 307, p. 282-290, 2003.
- DARBY, M., KUZMISKI, J.B., PANENKA, W., FEIGHAN, D., e MACVICAR, B.A. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. **J. Neurophysiol.**, vol. 89, p. 1870-1877, 2003.
- DAVOREN, P.R. e SUTHERLAND, E.W. THE CELLULAR LOCATION OF ADENYL CYCLASE IN THE PIGEON ERYTHROCYTE. **J. Biol. Chem.**, vol. 238, p. 3016-3023, 1963.
- DAYTON, P.G., YU, T.F., CHEN, W., BERGER, L., WEST, L.A., e GUTMAN, A.B. The physiological disposition of probenecid, including renal clearance, in man, studied by an improved method for its estimation in biological material. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 140, p. 278-286, 1963.
- DEAN, M. e ALLIKMETS, R. Complete characterization of the human ABC gene family. **J. Bioenerg. Biomembr.**, vol. 33, p. 475-479, 2001.
- DEAN, M., RZHETSKY, A., e ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Res.**, vol. 11, p. 1156-1166, 2001.
- DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., e TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol. Rev.**, vol. 51, p. 7-61, 1999.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C., e MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, vol. 22, p. 391-397, 1999.
- DUAN, W., GUO, Z., e MATTSON, M.P. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. **J. Neurochem.**, vol. 76, p. 619-626, 2001.
- DUGAN, L.L. e KIM-HAM, J.S. Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Seventh Edition ed., Siegel, G.J. Elsevier, p. 559-573, 2006.
- DURUKAN, A. e TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 87, p. 179-197, 2007.
- ERALY, S.A. Organic anion transporter 3 inhibitors as potential novel antihypertensives. **Pharmacol. Res.**, vol. 58, p. 257-261, 2008.

- FEIGIN, V.L., LAWES, C.M., BENNETT, D.A., e ANDERSON, C.S. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. **Lancet Neurol.**, vol. 2, p. 43-53, 2003.
- FELLER, N., BROXTERMAN, H.J., WAHRER, D.C., e PINEDO, H.M. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. **FEBS Lett.**, vol. 368, p. 385-388, 1995.
- FLO, K., HANSEN, M., ORBO, A., KJORSTAD, K.E., MALTAU, J.M., e SAGER, G. Effect of probenecid, verapamil and progesterone on the concentration-dependent and temperature-sensitive human erythrocyte uptake and export of guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP). **Scand. J. Clin. Lab Invest**, vol. 55, p. 715-721, 1995.
- FORLONI, G., LUCCA, E., ANGERETTI, N., CHIESA, R., e VEZZANI, A. Neuroprotective effect of somatostatin on nonapoptotic NMDA-induced neuronal death: role of cyclic GMP. **J. Neurochem.**, vol. 68, p. 319-327, 1997.
- FUKUI, S., SCHWARCZ, R., RAPOPORT, S.I., TAKADA, Y., e SMITH, Q.R. Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. **J. Neurochem.**, vol. 56, p. 2007-2017, 1991.
- GARCIA, J.H., YOSHIDA, Y., CHEN, H., LI, Y., ZHANG, Z.G., LIAN, J., CHEN, S., e CHOPP, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am. J. Pathol.**, vol. 142, p. 623-635, 1993.
- GERMANO, I.M., PITTS, L.H., MELDRUM, B.S., BARTKOWSKI, H.M., e SIMON, R.P. Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits. **Ann. Neurol.**, vol. 22, p. 730-734, 1987.
- GINSBERG, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, vol. 55, p. 363-389, 2008.
- GISCLON, L.G., BOYD, R.A., WILLIAMS, R.L., e GIACOMINI, K.M. The effect of probenecid on the renal elimination of cimetidine. **Clin. Pharmacol. Ther.**, vol. 45, p. 444-452, 1989.
- GODINHO, R.O. e COSTA, V.L., Jr. Regulation of intracellular cyclic AMP in skeletal muscle cells involves the efflux of cyclic nucleotide to the extracellular compartment. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 138, p. 995-1003, 2003.
- GOGEL, E., HALLORAN, B.P., e STREWLER, G.J. Probenecid inhibits the secretion of nephrogenous adenosine 3',5'-monophosphate in normal man. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, vol. 57, p. 689-693, 1983.
- GREEN, A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 153 Suppl 1, p. S325-S338, 2008.

- HAMPSON, A.J. e GRIMALDI, M. Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. **Eur. J. Neurosci.**, vol. 13, p. 1529-1536, 2001.
- HASSEL, B. e DINGLEDINE, R. Glutamate. In: **Basic Neurochemistry**. 7 ed., Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., e Price, D.L. Academic Press, London, p. 267-290, 2006.
- HATA, R., MIES, G., WIESSNER, C., FRITZE, K., HESSELBARTH, D., BRINKER, G., e HOSSMANN, K.A. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 18, p. 367-375, 1998.
- HENDERSON, G.B. e STRAUSS, B.P. Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. **J. Biol. Chem.**, vol. 266, p. 1641-1645, 1991.
- HEPP, R., TRICOIRE, L., HU, E., GERVASI, N., PAUPARDIN-TRITSCH, D., LAMBOLEZ, B., e VINCENT, P. Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. **J. Neurochem.**, vol. 102, p. 1875-1886, 2007.
- HERMANN, D.M., KILIC, E., SPUDICH, A., KRAMER, S.D., WUNDERLI-ALLENSPACH, H., e BASSETTI, C.L. Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. **Ann. Neurol.**, vol. 60, p. 489-498, 2006.
- HILMAS, C., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M., RASSOULPOUR, A., SCHWARCZ, R., e ALBUQUERQUE, E.X. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. **J. Neurosci.**, vol. 21, p. 7463-7473, 2001.
- HIRRLINGER, J., KONIG, J., e DRINGEN, R. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. **J. Neurochem.**, vol. 82, p. 716-719, 2002.
- HOOPER, D.C., SPITSIN, S., KEAN, R.B., CHAMPION, J.M., DICKSON, G.M., CHAUDHRY, I., e KOPROWSKI, H. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 95, p. 675-680, 1998.
- HORIKAWA, M., KATO, Y., e SUGIYAMA, Y. Reduced gastrointestinal toxicity following inhibition of the biliary excretion of irinotecan and its metabolites by probenecid in rats. **Pharm. Res.**, vol. 19, p. 1345-1353, 2002.
- HSYU, P.H., GISCLON, L.G., HUI, A.C., e GIACOMINI, K.M. Interactions of organic anions with the organic cation transporter in renal BBMV. **Am. J. Physiol**, vol. 254, p. F56-F61, 1988.

- HUANG, Z., HUANG, P.L., PANAHIAN, N., DALKARA, T., FISHMAN, M.C., e MOSKOWITZ, M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science**, vol. 265, p. 1883-1885, 1994.
- HUISMAN, M.T., CHHATTA, A.A., VAN TELLINGEN, O., BEIJNEN, J.H., e SCHINKEL, A.H. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. **Int. J. Cancer**, vol. 116, p. 824-829, 2005.
- IIJIMA, T., MIES, G., e HOSSMANN, K.A. Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 12, p. 727-733, 1992.
- JAEHDE, U., SORGEL, F., REITER, A., SIGL, G., NABER, K.G., e SCHUNACK, W. Effect of probenecid on the distribution and elimination of ciprofloxacin in humans. **Clin. Pharmacol. Ther.**, vol. 58, p. 532-541, 1995.
- JEDLITSCHKY, G., BURCHELL, B., e KEPPLER, D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. **J. Biol. Chem.**, vol. 275, p. 30069-30074, 2000.
- JOHNSON, J.W. e ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, vol. 325, p. 529-531, 1987.
- KAKEE, A., TAKANAGA, H., TERASAKI, T., NAITO, M., TSURUO, T., e SUGIYAMA, Y. Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, vol. 79, p. 110-118, 2001.
- KAKIZAKI, T., YOKOYAMA, Y., NATSUHORI, M., KARASAWA, A., KUBO, S., YAMADA, N., e ITO, N. Probenecid: its chromatographic determination, plasma protein binding, and in vivo pharmacokinetics in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, vol. 68, p. 361-365, 2006.
- KANDEL, E.R. e SIEGELBAUM, S.A. Synaptic Integration. In: **Principles of Neural Science**. Fourth ed., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., e Jessel, T.M. McGraw-Hill, p. 207-228, 2000a.
- KANDEL, E.R. e SIEGELBAUM, S.A. Synaptic Integration. In: **Principles of Neural Science**. Fourth ed., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., e Jessel, T.M. McGraw-Hill, p. 207-228, 2000b.
- KANDEL, E.R. e SIEGELBAUM, S.A. Synaptic Integration. In: **Principles of Neural Science**. Fourth ed., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., e Jessel, T.M. McGraw-Hill, p. 207-228, 2000c.
- KANG, D.H., HAN, L., OUYANG, X., KAHN, A.M., KANELIS, J., LI, P., FENG, L., NAKAGAWA, T., WATANABE, S., HOSOYAMADA, M., ENDOU, H., LIPKOWITZ, M., ABRAMSON, R., MU, W., e JOHNSON, R.J. Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. **Am. J. Nephrol.**, vol. 25, p. 425-433, 2005.

- KARAGULER, N.G., SESSIONS, R.B., BINAY, B., ORDU, E.B., e CLARKE, A.R. Protein engineering applications of industrially exploitable enzymes: *Geobacillus stearothermophilus* LDH and *Candida methylca* FDH. **Biochem. Soc. Trans.**, vol. 35, p. 1610-1615, 2007.
- KEMP, J.A. e MCKERNAN, R.M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nat. Neurosci.**, vol. 5 Suppl, p. 1039-1042, 2002.
- KIM, H.S., MIN, Y.D., e CHOI, C.H. Double-edged sword of chemosensitizer: increase of multidrug resistance protein (MRP) in leukemic cells by an MRP inhibitor probenecid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 283, p. 64-71, 2001.
- KNYIHAR-CSILLIK, E., CSILLIK, B., PAKASKI, M., KRISZTIN-PEVA, B., DOBO, E., OKUNO, E., e VECSEI, L. Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. **Neuroscience**, vol. 126, p. 899-914, 2004.
- KNYIHAR-CSILLIK, E., TOLDI, J., MIHALY, A., KRISZTIN-PEVA, B., CHADAIDE, Z., NEMETH, H., FENYO, R., e VECSEI, L. Kynurenine in combination with probenecid mitigates the stimulation-induced increase of c-fos immunoreactivity of the rat caudal trigeminal nucleus in an experimental migraine model. **J. Neural Transm.**, vol. 114, p. 417-421, 2007.
- KOERNER, I.P. e BRAMBRINK, A.M. Brain protection by anesthetic agents. **Curr. Opin. Anaesthesiol.**, vol. 19, p. 481-486, 2006.
- KOH, J.Y. e CHOI, D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **J. Neurosci. Methods**, vol. 20, p. 83-90, 1987.
- KOH, J.Y., WIE, M.B., GWAG, B.J., SENSI, S.L., CANZONIERO, L.M., DEMARO, J., CSERNANSKY, C., e CHOI, D.W. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. **Exp. Neurol.**, vol. 135, p. 153-159, 1995.
- KORF, J. Intracerebral trafficking of lactate in vivo during stress, exercise, electroconvulsive shock and ischemia as studied with microdialysis. **Dev. Neurosci.**, vol. 18, p. 405-414, 1996.
- KRISTIAN, T. e SIESJO, B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, vol. 29, p. 705-718, 1998.
- KURTH, T. e LOGROSCINO, G. Can we escape stroke and Alzheimer disease? **Stroke**, vol. 37, p. 279-280, 2006.
- LACY, S.A., HITCHCOCK, M.J., LEE, W.A., TELLIER, P., e CUNDY, K.C. Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys. **Toxicol. Sci.**, vol. 44, p. 97-106, 1998.

- LEE, J.M., ZIPFEL, G.J., e CHOI, D.W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. **Nature**, vol. 399, p. A7-A14, 1999.
- LEES, K.R. Neuroprotection. **Br. Med. Bull.**, vol. 56, p. 401-412, 2000.
- LIU, Y., WONG, T.P., AARTS, M., ROOYAKKERS, A., LIU, L., LAI, T.W., WU, D.C., LU, J., TYMIANSKI, M., CRAIG, A.M., e WANG, Y.T. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **J. Neurosci.**, vol. 27, p. 2846-2857, 2007.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosci. Methods**, vol. 96, p. 147-152, 2000.
- LODDER, J., VAN, R.L., HILTON, A., HARDY, E., e KESSELS, A. Diazepam to improve acute stroke outcome: results of the early GABA-Ergic activation study in stroke trial. a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Cerebrovasc. Dis.**, vol. 21, p. 120-127, 2006.
- LOU, G.L., PINSKY, C., e SITAR, D.S. Kynurenic acid distribution into brain and peripheral tissues of mice. **Can. J. Physiol Pharmacol.**, vol. 72, p. 161-167, 1994.
- LYNCH, D.R. e GUTTMANN, R.P. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. **Curr. Drug Targets.**, vol. 2, p. 215-231, 2001.
- LYNCH, D.R. e GUTTMANN, R.P. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 300, p. 717-723, 2002.
- MASEREEUW, R., VAN PELT, A.P., VAN OS, S.H., WILLEMS, P.H., SMITS, P., e RUSSEL, F.G. Probenecid interferes with renal oxidative metabolism: a potential pitfall in its use as an inhibitor of drug transport. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 131, p. 57-62, 2000.
- MATTSON, M.P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular. Med.**, vol. 3, p. 65-94, 2003.
- MATTSON, M.P., BARGER, S.W., BEGLEY, J.G., e MARK, R.J. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. **Methods Cell Biol.**, vol. 46, p. 187-216, 1995.
- MATTSON, M.P., CULMSEE, C., e YU, Z.F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res.**, vol. 301, p. 173-187, 2000.
- MILLER, J.M., MACGARVEY, U., e BEAL, M.F. The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations. **Neurosci. Lett.**, vol. 146, p. 115-118, 1992.

- MOK, M.H., FRICKER, A.C., WEIL, A., e KEW, J.N. Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. **Neuropharmacology**, vol. 57, p. 242-249, 2009.
- MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J., SOUZA, D.O., e TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem. Res.**, vol. 30, p. 83-89, 2005.
- MOLZ, S., THARINE, D.C., DECKER, H., e TASCA, C.I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. **Brain Res.**, vol. 1231, p. 113-120, 2008.
- MONTOLIU, C., LLANSOLA, M., KOSENKO, E., CORBALAN, R., e FELIPO, V. Role of cyclic GMP in glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. **Neuropharmacology**, vol. 38, p. 1883-1891, 1999.
- MORONI, F., RUSSI, P., LOMBARDI, G., BENI, M., e CARLA, V. Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. **J. Neurochem.**, vol. 51, p. 177-180, 1988.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**, vol. 258, p. 597-603, 1992.
- NEMETH, H., ROBOTKA, H., KIS, Z., ROZSA, E., JANAKY, T., SOMLAI, C., MAROSI, M., FARKAS, T., TOLDI, J., e VECSEI, L. Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylentetrazol-induced seizures. An electrophysiological and behavioural study. **Neuropharmacology**, vol. 47, p. 916-925, 2004.
- NEMETH, H., TOLDI, J., e VECSEI, L. Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. **Curr. Neurovasc. Res.**, vol. 2, p. 249-260, 2005.
- NEMETH, H., TOLDI, J., e VECSEI, L. Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies. **J. Neural Transm. Suppl**, p. 285-304, 2006.
- NORRIS, D.G., HOEHN-BERLAGE, M., DREHER, W., KOHNO, K., BUSCH, E., e SCHMITZ, B. Characterization of middle cerebral artery occlusion infarct development in the rat using fast nuclear magnetic resonance proton spectroscopic imaging and diffusion-weighted imaging. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 18, p. 749-757, 1998.
- NOZAKI, K. e BEAL, M.F. Neuroprotective effects of L-kynurenine on hypoxia-ischemia and NMDA lesions in neonatal rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 12, p. 400-407, 1992.
- OBRENOVITCH, T.P. e URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Prog. Neurobiol.**, vol. 51, p. 39-87, 1997.

- OLNEY, J.W. Excitatory amino-acids and neuropsychiatric disorders. **Biol. Psychiatry**, vol. 26, p. 505-525, 1989.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, vol. 164, p. 719-721, 1969.
- OLSEN, T.S. Regional cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery. **Acta Neurol. Scand.**, vol. 73, p. 321-337, 1986.
- OTT, R.J., HAI, A.C., e GIACOMINI, K.M. Mechanisms of interactions between organic anions and the organic cation transporter in renal brush border membrane vesicles. **Biochem. Pharmacol.**, vol. 40, p. 659-661, 1990.
- PALMER, G.C. Cyclic nucleotides in stroke and related cerebrovascular disorders. **Life Sci.**, vol. 36, p. 1995-2006, 1985.
- PARSONS, C.G., STOFFLER, A., e DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, vol. 53, p. 699-723, 2007.
- PELLICCIARI, R., RIZZO, R.C., COSTANTINO, G., MARINOZZI, M., AMORI, L., GUIDETTI, P., WU, H.Q., e SCHWARCZ, R. Modulators of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism: synthesis and preliminary biological evaluation of (S)-4-(ethylsulfonyl)benzoylalanine, a potent and selective kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor. **ChemMedChem.**, vol. 1, p. 528-531, 2006.
- PERKINS, M.N. e STONE, T.W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. **Brain Res.**, vol. 247, p. 184-187, 1982.
- PETERS, S.M., TIJSEN, M.J., VAN OS, C.H., WETZELS, J.F., e BINDELS, R.J. Hypoxia decreases calcium influx into rat proximal tubules. **Kidney Int.**, vol. 53, p. 703-708, 1998.
- POURCYROUS, M., BADA, H.S., YANG, W., PARFENOVA, H., WONG, S.P., KORONES, S.B., e LEFFLER, C.W. Prognostic significance of cerebrospinal fluid cyclic adenosine monophosphate in neonatal asphyxia. **J. Pediatr.**, vol. 134, p. 90-96, 1999.
- ROBOTKA, H., NEMETH, H., SOMLAI, C., VECSEI, L., e TOLDI, J. Systemically administered glucosamine-kynurenic acid, but not pure kynurenic acid, is effective in decreasing the evoked activity in area CA1 of the rat hippocampus. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 513, p. 75-80, 2005.
- ROSENBERG, P.A., KNOWLES, R., KNOWLES, K.P., e LI, Y. Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. **J. Neurosci.**, vol. 14, p. 2953-2965, 1994.

- ROSSI, F., SCHWARCZ, R., e RIZZI, M. Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, vol. 18, p. 748-755, 2008.
- ROZSA, E., ROBOTKA, H., VECSEI, L., e TOLDI, J. The Janus-face kynurenic acid. **J. Neural Transm.**, vol. 115, p. 1087-1091, 2008.
- RUSSI, P., ALESIANI, M., LOMBARDI, G., DAVOLIO, P., PELLICCIARI, R., e MORONI, F. Nicotylalanine increases the formation of kynurenic acid in the brain and antagonizes convulsions. **J. Neurochem.**, vol. 59, p. 2076-2080, 1992.
- RUSSI, P., CARLA, V., e MORONI, F. Indolpyruvic acid administration increases the brain content of kynurenic acid. Is this a new avenue to modulate excitatory amino acid receptors in vivo? **Biochem. Pharmacol.**, vol. 38, p. 2405-2409, 1989.
- RUTTNER, Z., LIGETI, L., REINLIB, L., HINES, K., e MCLAUGHLIN, A.C. Monitoring of intracellular free calcium in perfused rat liver. **Cell Calcium**, vol. 14, p. 465-472, 1993.
- SALT, T.E. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and D-serine in the rat thalamus in vivo. **Brain Res.**, vol. 481, p. 403-406, 1989.
- SAPOSNIK, G. e DEL BRUTTO, O.H. Stroke in South America: a systematic review of incidence, prevalence, and stroke subtypes. **Stroke**, vol. 34, p. 2103-2107, 2003.
- SAROFF, D., DELFS, J., KUZNETSOV, D., e GEULA, C. Selective vulnerability of spinal cord motor neurons to non-NMDA toxicity. **Neuroreport**, vol. 11, p. 1117-1121, 2000.
- SAS, K., ROBOTKA, H., ROZSA, E., AGOSTON, M., SZENASI, G., GIGLER, G., MAROSI, M., KIS, Z., FARKAS, T., VECSEI, L., e TOLDI, J. Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. **Neurobiol. Dis.**, vol. 32, p. 302-308, 2008.
- SCHEENEN, W.J., JENKS, B.G., ROUBOS, E.W., e WILLEMS, P.H. Spontaneous calcium oscillations in *Xenopus laevis* melanotrope cells are mediated by omega-conotoxin sensitive calcium channels. **Cell Calcium**, vol. 15, p. 36-44, 1994.
- SCHELL, M.J., BRADY, R.O., Jr., MOLLIVER, M.E., e SNYDER, S.H. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. **J. Neurosci.**, vol. 17, p. 1604-1615, 1997.
- SCHULTZ, C., VASKINN, S., KILDALSEN, H., e SAGER, G. Cyclic AMP stimulates the cyclic GMP egression pump in human erythrocytes: effects of probenecid, verapamil, progesterone, theophylline, IBMX, forskolin, and cyclic AMP on cyclic GMP uptake and association to inside-out vesicles. **Biochemistry**, vol. 37, p. 1161-1166, 1998.

- SCHURR, A., PAYNE, R.S., MILLER, J.J., TSENG, M.T., e RIGOR, B.M.  
Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia. **Brain Res.**, vol. 895, p. 268-272, 2001.
- SCHWARCZ, R. e PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 303, p. 1-10, 2002.
- SCHWARTZ-BLOOM, R.D., MILLER, K.A., EVENSON, D.A., CRAIN, B.J., e NADLER, J.V. Benzodiazepines protect hippocampal neurons from degeneration after transient cerebral ischemia: an ultrastructural study. **Neuroscience**, vol. 98, p. 471-484, 2000.
- SEET, R.C., KASIMAN, K., GRUBER, J., TANG, S.Y., WONG, M.C., CHANG, H.M., CHAN, Y.H., HALLIWELL, B., e CHEN, C.P. Is uric acid protective or deleterious in acute ischemic stroke? A prospective cohort study. **Atherosclerosis**, 2009.
- SEKINE, T., CHA, S.H., e ENDOU, H. The multispecific organic anion transporter (OAT) family. **Pflugers Arch.**, vol. 440, p. 337-350, 2000.
- SHICHINOHE, H., KURODA, S., YASUDA, H., ISHIKAWA, T., IWAI, M., HORIUCHI, M., e IWASAKI, Y. Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia. **Brain Res.**, vol. 1029, p. 200-206, 2004.
- SHINOSAKI, T. e YONETANI, Y. Hyperuricemia induced by the uricosuric drug probenecid in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, vol. 55, p. 461-468, 1991.
- SIESJO, B.K. Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, vol. 747, p. 140-161, 1994.
- SIESJO, B.K., KATSURA, K.I., KRISTIAN, T., LI, P.A., e SIESJO, P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. **Acta Neurochir. Suppl**, vol. 66, p. 8-14, 1996.
- SILVEIRA, M.S. e LINDEN, R. Neuroprotection by cAMP: Another brick in the wall. **Adv. Exp. Med. Biol.**, vol. 557, p. 164-176, 2006.
- SILVERMAN, W., LOCOVEI, S., e DAHL, G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, vol. 295, p. C761-C767, 2008.
- SIMON, R.P., YOUNG, R.S., STOUT, S., e CHENG, J. Inhibition of excitatory neurotransmission with kynurenate reduces brain edema in neonatal anoxia. **Neurosci. Lett.**, vol. 71, p. 361-364, 1986.
- SOUTHAM, E., EAST, S.J., e GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. **J. Neurochem.**, vol. 56, p. 2072-2081, 1991.

- SPECIALE, C. e SCHWARGZ, R. Uptake of kynurenine into rat brain slices. **J. Neurochem.**, vol. 54, p. 156-163, 1990.
- SUTHERLAND, E.W. e RALL, T.W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **J. Biol. Chem.**, vol. 232, p. 1077-1091, 1958.
- SWANSON, R.A., MORTON, M.T., TSAO-WU, G., SAVALOS, R.A., DAVIDSON, C., e SHARP, F.R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 10, p. 290-293, 1990.
- TAYLOR, D.L., OBRENOVITCH, T.P., e SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochem. Res.**, vol. 21, p. 1013-1021, 1996.
- TAYLOR, D.L., URENJAK, J., ZILKHA, E., e OBRENOVITCH, T.P. Effects of probenecid on the elicitation of spreading depression in the rat striatum. **Brain Res.**, vol. 764, p. 117-125, 1997.
- THIELS, E., WEISZ, D.J., e BERGER, T.W. In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation by the glycine modulatory site. **Neuroscience**, vol. 46, p. 501-509, 1992.
- TJORNHAMMAR, M.L., LAZARIDIS, G., e BARTFAI, T. Efflux of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate from cerebellar slices stimulated by L-glutamate or high K<sup>+</sup> or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Neurosci. Lett.**, vol. 68, p. 95-99, 1986.
- TJORNHAMMAR, M.L., LAZARIDIS, G., e BARTFAI, T. Cyclic GMP efflux from liver slices. **J. Biol. Chem.**, vol. 258, p. 6882-6886, 1983.
- TOUNG, T.J., KIRSCH, J.R., e TRAYSTMAN, R.J. Enhanced recovery of brain electrical activity by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate following complete global cerebral ischemia in dogs. **Crit Care Med.**, vol. 24, p. 103-108, 1996.
- TRIBUTINO, J.L.M. **Estudo do perfil antiinflamatório e neuroprotetor de novos análogos do composto LASSBio 294.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- VAMOS, E., PARDUTZ, A., FEJES, A., TAJTI, J., TOLDI, J., e VECSEI, L. Modulatory effects of probenecid on the nitroglycerin-induced changes in the rat caudal trigeminal nucleus. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 621, p. 33-37, 2009a.
- VAMOS, E., PARDUTZ, A., KLIVENYI, P., TOLDI, J., e VECSEI, L. The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection. **J. Neurol. Sci.**, vol. 283, p. 21-27, 2009b.
- VAMOS, E., VOROS, K., ZADORI, D., VECSEI, L., e KLIVENYI, P. Neuroprotective effects of probenecid in a transgenic animal model of Huntington's disease. **J. Neural Transm.**, vol. 116, p. 1079-1086, 2009c.

- VAN AUBEL, R.A., SMEETS, P.H., PETERS, J.G., BINDELS, R.J., e RUSSEL, F.G. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. **J. Am. Soc. Nephrol.**, vol. 13, p. 595-603, 2002.
- VECSEI, L., MILLER, J., MACGARVEY, U., e BEAL, M.F. Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. **Brain Res. Bull.**, vol. 28, p. 233-238, 1992.
- VILLMANN, C. e BECKER, C.M. On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. **Neuroscientist.**, vol. 13, p. 594-615, 2007.
- WADA, M., TOH, S., TANIGUCHI, K., NAKAMURA, T., UCHIUMI, T., KOHNO, K., YOSHIDA, I., KIMURA, A., SAKISAKA, S., ADACHI, Y., e KUWANO, M. Mutations in the canilicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, vol. 7, p. 203-207, 1998.
- WAXMAN, E.A. e LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. **Neuroscientist.**, vol. 11, p. 37-49, 2005.
- WEISS, J.H., HARTLEY, D.M., KOH, J., e CHOI, D.W. The calcium channel blocker nifedipine attenuates slow excitatory amino acid neurotoxicity. **Science**, vol. 247, p. 1474-1477, 1990.
- WERNER, C., REEKER, W., ENGELHARD, K., LU, H., e KOCHS, E. [Ketamine racemate and S-(+)-ketamine. Cerebrovascular effects and neuroprotection following focal ischemia]. **Anaesthetist**, vol. 46 Suppl 1, p. S55-S60, 1997.
- WILCOX, K.S., FITZSIMONDS, R.M., JOHNSON, B., e DICHTER, M.A. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. **J. Neurophysiol.**, vol. 76, p. 3415-3424, 1996.
- WOOD, P.L., EMMETT, M.R., RAO, T.S., MICK, S., CLER, J., e IYENGAR, S. In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. **J. Neurochem.**, vol. 53, p. 979-981, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. vol. Fact sheet 310, p. 1-5, 2008.
- XI, G.M., WANG, H.Q., HE, G.H., HUANG, C.F., e WEI, G.Y. Evaluation of murine models of permanent focal cerebral ischemia. **Chin Med. J. (Engl. )**, vol. 117, p. 389-394, 2004.
- YANG, Y., SHUAIB, A., e LI, Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. **J. Neurosci. Methods**, vol. 84, p. 9-16, 1998.

YU, Z.F., BRUCE-KELLER, A.J., GOODMAN, Y., e MATTSON, M.P. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. **J. Neurosci. Res.**, vol. 53, p. 613-625, 1998.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, New Jersey, p. 123-161, 1996.

ZÉTOLA, V.H., NÓVAK, E.M., CAMARGO, C.H., CARRARO, H., Jr., CORAL, P., MUZZIO, J.A., IWAMOTO, F.M., DELLA COLETA, M.V., e WERNECK, L.C. [Stroke in young adults: analysis of 164 patients]. **Arq. Neuropsiquiatr.**, vol. 59, p. 740-745, 2001.

ZHAN, X., FAHLMAN, C.S., e BICKLER, P.E. Isoflurane neuroprotection in rat hippocampal slices decreases with aging: changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation and N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. **Anesthesiology**, vol. 104, p. 995-1003, 2006.

# 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](#)