

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Departamento de Medicina Clínica
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará

**1,8 Cineol reduz a toxicidade intestinal e o aumento de
fibrinogênio plasmático induzido pela Indometacina em ratos**

Ana Cristina de Oliveira e Silva

Fortaleza – 2001

? X

Universidade Federal do Ceará
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Departamento de Medicina Clínica
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará

**1,8 Cineol reduz a toxicidade intestinal e o aumento de
fibrinogênio plasmático induzido pela Indometacina em ratos**

Ana Cristina de Oliveira e Silva

Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Orientadora

Marcos Antônio Martins da Silva
Co-orientador

Monografia apresentada como requisito final
do Curso de Especialização em Hematologia
e Hemoterapia do Centro de Hematologia e
Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e
Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza – 2001

Aos meus pais, **José Inácio e Rosany Guedes, irmãos e familiares**, que mesmo à distância me apoiaram e me deram força para realização deste trabalho.

... um caminho é só um caminho. Não é desrespeito a si
ou aos outros abandoná-lo, se é isso que o coração nos
diz. Devemos examinar cada caminho com muito cuidado
e deliberação, tentar várias vezes, tantas quantas julgar-
mos necessárias.

Então, perguntar para si mesmo: "Esse caminho tem
coração?"

Se tem, o caminho é bom, se não tem, o caminho não
Me serve.

Um caminho, é só um caminho".

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me deu vida e por me dar força e coragem para prosseguir ...

A **Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha** (Profª de Fisiologia do Departamento de Farmacologia e Fisiologia/UFC) e **Dr. Vietla Satyanarayana Rao** (Profº de Farmacologia do Departamento de Farmacologia e Fisiologia/UFC), pela disponibilidade, paciência e confiança na elaboração deste trabalho.

A **Dr. Marcos Antônio Martins da Silva**, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade do HEMOCE, pelo incentivo e acima de tudo boa vontade e compreensão que teve para me dirigir nesta tarefa.

Ao **Dr. Gentil Claudino de Galiza Neto**, Hematologista do Hospital Universitário Walter Cantídeo, pela atenção.

Aos meus **colegas de turma** pelo companheirismo e amizade.

A funcionária do Laboratório de Hemostasia, **Kátia Valéria Lima de Oliveira**, e ao bolsista do Departamento de Farmacologia **Flávio Damasceno Maia** pelo auxílio.

A **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Em especial, ao meu avô materno **Orlando Falcone de Oliveira** (in memoriam) que onde estiver estará guiando meus caminhos e me indicando a melhor opção a seguir.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMO	16
PREFÁCIO	18
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES (AINES)	21
1.2. INDOMETACINA	26
1.3. BETAMETASONA	34
1.4. CINEOL	39
1.5. SISTEMA DE COAGULAÇÃO	40
1.6. FIBRINÓLISE	48
2. OBJETIVOS	52
2.1. OBJETIVO GERAL	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3. METODOLOGIA	54
3.1. ANIMAIS	54
3.2. DROGAS	55
3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	55
3.4. ESTUDO DA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE	55
3.5. FUNÇÃO HEPÁTICA	58
3.6. CULTURA DO LAVADO PERITONIAL	59
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	60

4. RESULTADOS	62
6. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÃO	80
7. SUMMARY	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Efeito da Indometacina sobre o Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	63
TABELA 2	Estudo microbiológico do lavado peritoneal nos animais tratados com Indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona.	69
TABELA 3	Efeito da Indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona sobre o número de plaquetas.	70
TABELA 4	Efeito da Indometacina sobre os níveis de Fator XIII e Produtos de Degradação da Fibrina.	71
TABELA 5	Efeito da Indometacina sobre os níveis de Alanina Amino Transferase e Gama Glutamil Transferase.	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da Indometacina	27
FIGURA 2	Efeito da Indometacina sobre os níveis de Fibrinogênio.	64
FIGURA 3a	Animal pertencente ao grupo controle.	65
FIGURA 3b	Animal tratado com Indometacina apresentando malha de fibrina.	65
FIGURA 3c	Animal tratado com 1,8 Cineol não apresentou malha de fibrina e lesão intestinal.	66
FIGURA 3d	Animal tratado com Betametasona não apresentou malha de fibrina e lesão intestinal.	66
FIGURA 4	Animal tratado com Indometacina apresentando lesão intestinal observada macroscopicamente.	67

ABREVIATURAS

γ-GT	Gama glutamil transferase
5-HT	5 – hidroxitriptamina
12-HETE	12 – ácido graxo hidroxí
12-HPETE	12 – ácido hidroperoxieicosatetraenóico
AINEs	Antiinflamatórios não-esteróides
ALT	Alanina amino transferase
ATIII	Antitrombina III
Ca ⁺⁺	Cálcio
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
COX-1	Ciclooxigenase – 1
COX-2	Ciclooxigenase – 2
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPM	Erro padrão da média
FI	Fibrinogênio
FII	Protrombina
FIII	Fator tissular ou tromboplastina
FIV	Cálcio
FIX	Fator Christmas, componente tromboplástico do plasma ou fator anti-hemofílico
FIXa	Fator IX ativado
FTC-β1	Fator transformados do crescimento β1
FV	Proacelerina ou fator lábil ou globulina aceleradora ou trombogênio
FVII	Proconvertina, fator estável ou autoprotrombina I

FVIII	Globulina anti-hemofílica ou fator anti-hemofílico
FVIIIa	Fator VIII ativado
FX	Fator Stuart-prower ou autoprotrombina III
FXa	Fator X ativado
FXI	Antecedente tromboplástico do plasma ou fator anti-hemofílico C
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator Hageman
FXIII	Fator estabilizador da fibrina ou fator Laki-Lorand; fator fletcher ou precalicreína; fator fitzgerald ou cininogênio de alto peso molecular (HMWK); Proteína C; proteínas S, M, Z
FXIIIa	Fator XIII ativado
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
IL-1	Interleucina – 1
IL-10	Interleucina – 10
IL-2	Interleucina – 2
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzido
LPS	Lipossacarídeos
LTB4	Leucotrieno B4
MACV-1	Molécula de adesão das células vasculares – 1
MAIC-1	Molécula de adesão intracelular – 1
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxila
PAF	Fator de ativação plaquetária (<i>platelet-activing factor</i>)
PDF	Produtos de degradação da fibrina

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂	Prostaglandinas E ₂
PGG₂	Prostaglandinas G ₂
PGH₂	Prostaglandinas H ₂
PGI₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PTA	Antecedente tromboplástico do plasma
s.c	Subcutânea
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador tissular do plasminogênio
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TXA₂	Tromboxane A ₂
v.o.	Via oral
Vit k	Vitamina K
VWF	Fator de von Willebrand

RESUMO

RESUMO

A Indometacina, derivado indol metilado, um dos mais potentes inibidores da cicloxigenase *in vitro*, é um antiinflamatório não-esteróide clinicamente eficaz, mas com elevada incidência de efeitos colaterais. Usado para tratar artrite reumática e doenças semelhantes, a Indometacina induz inflamação na mucosa intestinal e úlceras em pacientes. Neste trabalho foi analisado o efeito desta droga sobre o epitélio intestinal e o aumento nos níveis de fibrinogênio plasmático induzido pela mesma. Ratos foram tratados com Indometacina (5 mg/Kg), 1,8 Cineol (400 mg/Kg), um um óxido terpenóico presente em muitas plantas de óleos essenciais, e Betametasona (1,5 mg/Kg), via oral, num período de 4 dias. Os animais foram submetidos a coleta de sangue no quarto dia de tratamento, através da punção do plexo orbital do olho, após serem anestesiados com éter. O sangue foi colocado em tubos contendo citrato de sódio a 3,8%, tendo-se o cuidado de observar a presença de hemólise e/ou rede de fibrina para consequente eliminação. Os parâmetros estudados foram: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), fibrinogênio, contagem de plaquetas, fator XIII, produtos de degradação da fibrina (PDF), cultura do lavado peritoneal e avaliação hepática (ALT, γ -GT). Os resultados do TP, TTPA, contagem de plaquetas, FXIII e Pdf mantiveram-se normais em relação ao grupo controle. Nos animais tratados com Indometacina ($473,07 \pm 15,84$) observamos um aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis de fibrinogênio sendo este aumento revertido pelo tratamento com 1,8 Cineol ($293,42 \pm 33,6$) e Betametasona ($279,21 \pm 30,7$). Os animais tratados com Indometacina apresentaram positividade em 75% das culturas realizadas para enterobactérias, demonstrando assim a presença de bactérias do trato gastrointestinal na cavidade peritoneal, provavelmente devido a uma perfuração intestinal induzida pela droga. As drogas estudadas não demonstraram efeito hepatotóxico como demonstrado pelos níveis normais das enzimas ALT e γ -GT. Concluímos que 1,8 cineol apresentou um excelente efeito enteroprotetor, podendo ser útil como coadjuvante no tratamento de pacientes com doença inflamatória crônica.

PREFÁCIO

PREFÁCIO

As bases para o desenvolvimento da ciência farmacológica incluem necessariamente o conhecimento dos constituintes fundamentais dos elementos do Reino Vegetal.

A enorme variedade de espécie de plantas tem permitido ao longo da história da humanidade a descoberta intencional e ocasionalmente acidental de substâncias capazes de interferir na fisiologia para obtenção da homeostase humana.

Embora os efeitos benéficos atribuídos a estas substâncias, as quais manipuladas industrialmente para benefício humano que chamamos de drogas, suplantem os riscos de sua utilização inúmeros efeitos adversos e conseqüentes a uso de tais substâncias tem merecido atenção especial de pesquisadores de todo o mundo.

Uma forma clássica de efeito colateral atribuído a algumas substâncias refere-se ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais, os quais por seu princípio de ação inibem a enzima ciclooxigenase e, ao mesmo tempo, contralateralmente promovem a facilidade de lesões a nível gástrico, pela perda do fator protetor da mucosa.

De uma forma ou de outra as drogas são capazes de interferir em diversos mecanismos fisiológicos humanos, algumas vezes alcançando o êxito esperado, mas ao mesmo tempo provocando efeitos indesejados.

Por esta razão, há muitos anos a indústria farmacêutica vem desenvolvendo drogas antiinflamatórias cada vez mais seletivas a fim de diminuir estes para-efeitos a nível gástrico. É provável que o desenvolvimento de novos AINEs prossiga até que o significado clínico da inibição da COX-2 e da lipoxigenase possa ser totalmente avaliadas como inibidores mais seletivos.

A avaliação de uma dessas drogas antiinflamatórias, a Indometacina, sobre os mecanismos homeostáticos e fibrinolíticos constitui-se o tema fundamental dessa pesquisa; Além disso se avaliam a ação de um terpenóide

isolado de óleos essenciais, o 1,8 Cineol, sobre o desenvolvimento de lesões intestinais induzido pela Indometacina.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A partir de 1949, o estudo dos mecanismos da inflamação e da ação de agentes antiinflamatórios desenvolveu-se aceleradamente após as primeiras constatações clínicas dos notáveis efeitos da cortisona e da fenilbutazona. A pesquisa de antiinflamatórios concentrou-se no campo dos esteróides, verificando-se que alguns dos novos esteróides sintéticos (prednisolona, dexametasona e outros) são mais potentes do que os de ocorrência natural (Zanine, 1989).

O interesse pelos antiinflamatórios não-esteróides foi despertado somente na década de 1960, com o aparecimento de novos fármacos. Assim, em 1963, a indometacina foi introduzida e apresentou proeminentes efeitos no tratamento da espondilite anquilosante e da artrite gotosa aguda (Zanine, 1989).

Persiste ainda a necessidade de se desenvolver classe verdadeiramente nova de agentes que sejam eficazes no combate a fator etiológico da doença, pois, entretanto, esses agentes apenas moderam a intensidade dos sinais e sintomas da inflamação, não eliminando a moléstia (Zanine, 1989).

Recentemente, tem-se dada especial atenção aos metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandinas e outros, que são biologicamente ativos e exercem importantes funções nas reações inflamatórias (Zanine, 1989).

As prostaglandinas (PGs), metabólitos da via cicloxigenase (COX), são potentes mediadores da resposta inflamatória. A cicloxigenase existe em pelo menos duas isoformas: a cicloxigenase-1 (COX-1), é enzima constitutiva, destinada a funções fisiológicas decorrentes da síntese de prostaglandinas, e a cicloxigenase-2 (COX-2), é induzível por processos inflamatórios, ativação mitogênica para proliferação celular, interleucinas (IL-1, IL-2), fatores de crescimento (EGF, PDGF), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), promotores tumorigênicos (como ésteres do forbol) e outros fatores presentes no soro normal (Fuchs e Wannmacher, 1998). O desenvolvimento de novos antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) intensificou-se na pesquisa de inibidores da COX-2. Vários

compostos sintetizados, que inibem preferencialmente COX-2, como nabumetona, meloxicam, nimesulide, dentre outros, que seriam desprovidos de efeitos gastrointestinais e renais, que freqüentemente estão associados aos AINEs, também podem induzir toxicidade gastrointestinal, particularmente quando são empregadas altas doses. Contudo, o benefício da inibição preferencial de COX-2, em relação a COX-1, nos estados inflamatórios ainda não foi completamente comprovada (Santos, 1999).

Através da propriedade dos antiinflamatórios não-esteróides de inibir a biotransformação do ácido araquidônico pode se explicar a redução na formação de radical hidroxila (OH), que é extremamente citotóxico. O ácido hialurônico é despolimerizado por esse radical, com destruição do tecido colágeno (Zanine, 1989).

Fenômenos imunológicos são observados em certos tipos de inflamação, como artrite reumatóide, onde ocorre reação entre antígeno (gamaglobulina), anticorpo (fator reumatóide) e complemento, com conseqüente liberação de fatores quimiotáticos. Estes fatores atraem os leucócitos que, por sua vez, fagocitam o complexo antígeno-anticorpo-complemento e liberam as enzimas contidas nos seus lisossomas. As enzimas lisossômicas lesam a cartilagem e outros tecidos, propiciando o agravamento do processo inflamatório. Durante a fagocitose ocorre também a síntese de prostaglandinas, sob a ação de fosfolipases lisossômicas que liberam os ácidos graxos precursores (Zanine, 1989).

Vários tipos de leucócitos desempenham função essencial na inflamação. Estudos recentes investigaram a função das células endoteliais e moléculas de adesão celular, incluindo-se as selectinas E, P e L, a molécula de adesão intracelular-1 (MAIC-1), a molécula de adesão das células vasculares-1 (MACV-1) e as integrinas leucocitárias na adesão dos leucócitos, plaquetas e endotélio nos locais inflamatórios. As células endoteliais ativadas desempenham um papel fundamental na "orientação" das células circulantes para os locais inflamatórios. A adesão celular parece ocorrer pelo reconhecimento das glicoproteínas e carboidratos da superfície celular das células circulantes pelas moléculas de adesão, cuja expressão foi intensificada nas células residentes.

Assim, a ativação endotelial resulta na adesão dos leucócitos por meio de sua interação com as selectinas L e P recém-expressas, enquanto a selectina E expressa pelo endotélio interage com a glicoproteína X sializada de Lewis e outras glicoproteínas existentes na superfície dos leucócitos; a MAIC-1 endotelial interage com as integrinas leucocitárias. Os AINEs podem inibir a expressão ou a atividade de algumas dessas moléculas da adesão celular, embora pouco se saiba sobre isto hoje em dia (Hardaman et al., 1996).

O recrutamento das células inflamatórias para os locais de lesão envolve interações simultâneas de vários tipos de mediadores solúveis, além das moléculas de adesão celular descritas anteriormente, estes incluem o fator C5a do complemento, o fator ativador plaquetário e o leucotrieno B₄. Várias citocinas também parecem desempenhar um papel essencial na orquestração do processo inflamatório, especialmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF). Esses dois fatores são considerados os mediadores principais das respostas biológicas aos lipolissacarídeos bacterianos (endotoxinas) e muitos outros estímulos infecciosos. A IL-1 e TNF produzem muitas das mesmas respostas pró-inflamatórias, que incluem a indução da febre, sono e anorexia; mobilização e ativação dos leucócitos polimorfonucleados; indução das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase; aumento da expressão das moléculas de adesão; ativação dos linfócitos B, T e células exterminadoras naturais; e estimulação e produção de outras citocinas. Outras ações desses fatores provavelmente contribuem para a fibrose e a degeneração tecidual da fase proliferativa crônica da inflamação: estimulação da proliferação dos fibroblastos, indução da collagenase e ativação dos osteoblastos e osteoclastos (Hardaman et al., 1996).

Para compensar os efeitos dos mediadores pró-inflamatórios, outras citocinas e fatores de crescimento têm sido envolvidos na atividade antiinflamatória. Estes incluem o fator transformador do crescimento $\beta 1$ (FTC- $\beta 1$, que aumenta a formação da matriz intracelular, porém também atua como imunossupressor), interleucina-10 (IL-10) e interferon gama (Hardaman et al., 1996).

A histamina encontra-se amplamente distribuída nos tecidos e sua fonte mais rica são os mastócitos normalmente presentes nos tecidos conjuntivo

adjacente aos vasos sanguíneos; é também encontrada em basófilos e em plaquetas sanguíneas. A histamina gera dilatação das arteríolas e aumenta a permeabilidade vascular das vênulas (entretanto, induz uma constrição das grandes artérias). É considerada como o principal mediador da fase imediata do aumento da permeabilidade vascular e gera uma contração do endotélio venular e um alargamento de junções celulares interendoteliais. Atua sobre a microcirculação basicamente através dos receptores H_1 (Cotran et al., 1996).

A bradicinina e a 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) também podem ser importantes na mediação da inflamação, porém seus antagonistas atenuam apenas alguns tipos de respostas inflamatórias (Hardaman et al., 1996). O fator ativador plaquetário (*platelet-activing factor* – PAF) é um outro mediador derivado dos fosfolípidios que apresenta múltiplos efeitos inflamatórios. Além de estimular as plaquetas, o PAF causa vasoconstrição, broncoconstrição e, em concentrações extremamente baixas, induz vasodilatação e aumento da permeabilidade venular; gera também um aumento da adesão leucocitária ao endotélio, da quimiotaxia, da desgranulação e um "surto" oxidativo. O LTB_4 , um potente agente quimiotático, causa agregação de neutrófilos. O óxido nítrico (NO) está envolvido na vasodilatação e na toxicidade (Cotran et al., 1996).

1.1. ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES (AINEs)

Os Antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os mais largamente usados de todos os agentes terapêuticos. São prescritos para queixas músculoesqueléticas "reumáticas" bem como tomados sem prescrição para dores menores (Rang et al., 1997). Os objetivos terapêuticos são vários, dada a multiplicidade de manifestações clínicas das doenças reumáticas. Diminuição de dor, eritema e edema são medidas de eficácia dos AINEs (Fuchs e Wannmacher, 1998). Não são ideais no controle ou modificação dos sinais e sintomas da inflamação, sobretudo nas doenças articulares inflamatórias comuns (Rang et al., 1997).

Os AINEs são agrupados em várias classes químicas: derivados indólicos (Indometacina), oxicans (Piroxican), derivados do ácido propiônico

(Ibuprofeno), derivados do ácido pirrolalcanóico (Tolmetina), derivados do ácido fenilalcanóico (Flurbiprofeno), derivados do ácido fenilacético (Diclofenaco), derivados de pirazolona (Fenilbutasona), pró-droga do ácido naftilacético (Nabumetona), classe dos fenamatos (ácido meclofenâmico). Esta diversidade química resulta numa gama ampla de características farmacocinéticas (Katsung, 1994).

1.1.1. MECANISMO DE AÇÃO

A inibição da cicloxigenase, enzima responsável pela biossíntese das prostaglandinas e alguns autacóides correlatos, geralmente parece ser um componente importante do mecanismo de ação dos AINEs (Hardaman et al., 1996).

As prostaglandinas desempenham um importante papel no mecanismo da dor, febre e inflamação. As prostaglandinas são originadas do ácido araquidônico, após este ser liberado dos fosfolípidos por ação da enzima fosfolipase A₂, fosfolipase C e lipase diglicerídica. O ácido araquidônico sofre ação enzimática da cicloxigenase e da lipoxigenase. A via cicloxigenase apresenta atividades de cicloxigenase propriamente dita – que insere duas moléculas de oxigênio no ácido araquidônico, dando origem a PGG₂ – e de peroxidase que transforma esse intermediário em PGH₂. PGG₂ tem extrema reatividade química. O sítio catalítico dessa reação pode ser inibido irreversivelmente por aspirina (ácido acetilsalicílico) que acetila a molécula da COX ou reversivelmente por indometacina e outros antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) que competem com ácido araquidônico. Essa ação explica os efeitos antiinflamatórios dos AINEs (Fuchs e Wannmacher, 1998).

A cicloxigenase controla a produção das prostaglandinas, e, portanto, a inflamação e a inibição da produção ácida gástrica (Brody et al., 1990).

A COX-1 é uma isoforma constitutiva encontrada nos vasos sangüíneos, estômago e rins, enquanto a COX-2 é induzida no contexto inflamatório pelas citocinas e mediadores da inflamação. O destino dos produtos da cicloxigenase PGG₂/PGH₂ varia entre os diferentes tecidos, dependendo das

atividades enzimáticas metabolizantes destes compostos no tecido em questão. O ácido araquidônico também pode ser convertido pela 12-lipoxigenase em 12-HPETE e 12-HETE ou, pela via da 5-lipoxigenase, em vários leucotrienos, os quais também podem ser inibidos pelos AINEs (Hardaman et al., 1996).

Outros processos que não estão relacionados com a inibição da biossíntese das prostaglandinas e que são considerados como resultando das altas doses de AINEs incluem os efeitos sobre a fosfolipase C, a síntese dos proteoglicanos pelos condrócitos, o fluxo iônico e a fixação célula-célula (Brody et al., 1990).

Outra ação dos AINEs é inibir diretamente a ativação e a função dos neutrófilos, talvez pela inibição dos processos ligados à membrana, independente da sua capacidade de suprimir a síntese das prostaglandinas (Hardaman et al., 1996), e podem desmascarar a atividade supressora das células T para inibir a produção do fator reumatóide (Brody et al., 1990).

Os AINEs reduzem sobretudo os componentes da resposta inflamatória e imune em que os produtos da ação da COX-2 contribuem significativamente para vasodilatação, edema (por uma ação indireta: vasodilatação facilita e potencia a ação de mediadores como a histamina, que aumentam a permeabilidade das vênulas pós capilar) e dor (Rang et al., 1997).

Os inibidores da cicloxigenase, por si sós, não tem nenhum efeito sobre aqueles processos (liberação de enzimas lisossômicas, produção de radicais de O_2 tóxicos) que contribuem para os danos teciduais a longo prazo, pois algumas prostaglandinas (por exemplo a PGE_2 e PGI_2) diminui a liberação de enzimas lisossômicas, reduzem a geração de produtos de O_2 tóxicos, inibem a ativação de linfócitos (Rang et al., 1997).

Seria conveniente desenvolver um bloqueador seletivo da COX-2 para tratamento da inflamação, uma vez que não afetaria as outras funções das prostaglandinas (Katsung, 1994). O bloqueador seletivo para COX-2 produzem danos menos gástrico que os AINEs convencionais, sugerindo que AINEs causam dano inibindo a COX-1 (Wallace et al., 2000).

O tratamento de pacientes com inflamação tem dois objetivos básicos: em primeiro lugar, o alívio da dor, que quase sempre constitui o sintoma inicial e a principal queixa do paciente; e, em segundo lugar, retardar ou – teoricamente – interromper o processo responsável pela lesão tecidual. A redução da inflamação com agentes antiinflamatórios quase sempre produz alívio da dor durante um período significativo de tempo (Katsung, 1994).

1.1.2. ATIVIDADES TERAPÊUTICAS

Todos os AINEs são antipiréticos, analgésicos e antiinflamatórios, porém existem diferenças importantes em suas atividades (Hardaman et al., 1996).

Quando utilizados com analgésicos, esses medicamentos são eficazes apenas para dor de intensidade de leve a moderada (Hardaman et al., 1996). Evidências recentes tem mostrado que os AINEs injetados no canal espinhal podem produzir analgesia e sugerem que a inibição da geração de prostaglandinas na medula espinhal pode contribuir para a sua ação analgésica (Rang et al., 1997).

Como antipiréticos, os AINEs reduzem a temperatura corpórea; esse mecanismo é considerado pelo menos em parte, como inibição da produção de prostaglandinas no hipotálamo. Durante uma reação inflamatória, as endotoxinas bacterianas fazem com que os macrófagos liberem um pirógeno – IL-1 – e há evidências de que a IL-1 estimula a produção no hipotálamo das prostaglandinas tipo E e que estas, por sua vez, podem causar a elevação do ponto de ajuste da temperatura (Rang et al., 1997).

Sua ação antiinflamatória decorre da inibição de síntese de prostaglandinas, efetuada mediante a inativação das ciclooxigenase constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2) (Fuchs e Wannmacher, 1998). Em geral, os AINEs proporcionam apenas alívio sintomático da dor e inflamação associadas a doença e não interrompem a progressão da lesão patológica dos tecidos durante os episódios graves (Hardaman et al., 1996).

1.1.3. EFEITOS COLATERAIS

Além das diversas atividades terapêuticas em comum, os AINEs compartilham vários efeitos colaterais indesejáveis, presumivelmente devidos à inibição da cicloxigenase (Fuchs e Wannmacher, 1998). Os mais frequentes (6 – 33%) são distúrbios gastrintestinais, atribuídos à redução do efeito citoprotetor gástrico das prostaglandinas. O aumento do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, a estimulação da secreção de muco e bicarbonato e a diminuição de ácido livre desaparecem com o bloqueio da síntese daqueles compostos. As manifestações digestivas incluem eritema e erosões gástricas, ulceração gástrica e duodenal, dispepsia, dor epigástrica, náuseas e vômitos, anorexia, flatulência, diarreia e perda de sangue pelo tubo digestivo (Fuchs e Wannmacher, 1998).

A função plaquetária é alterada porque os AINEs impedem a formação, pelas plaquetas, do tromboxano A_2 (TXA₂), um potente agente agregante. Isso explica a tendência que estes medicamentos tem de aumentar o tempo de sangramento. Os AINEs tem pouco efeito sobre a função renal dos seres normais, talvez porque a produção das prostaglandinas vasodilatadoras tenha função apenas secundária nos indivíduos com níveis normais de sódio. Entretanto estes medicamentos reduzem o fluxo sangüíneo renal e a taxa de filtração glomerular dos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática com ascite; doença renal crônica ou hipovolemia. Além dos efeitos hemodinâmicos nos rins, os AINEs promovem retenção de sal e água, reduzindo a inibição da reabsorção de cloreto e a ação do hormônio antidiurético induzidas pelas prostaglandinas. Isto pode causar edema em alguns pacientes tratados com AINEs e também diminuir a eficácia dos esquemas anti-hipertensivos (Hardaman et al., 1996).

A freqüência, natureza e gravidade dos efeitos tóxicos variam de droga assim como na dose, mas basicamente todas são capazes de gerar distúrbios gástricos (úlceras inclusive) como também fenômenos hemorrágicos decorrentes de tratamento prolongados; para contornar esta situação empregam-se substâncias que protejam a mucosa do estômago (embora reduza sua absorção em até 40%) ou antiácidos.

1.2. INDOMETACINA

A indometacina foi o primeiro resultado de uma pesquisa laboratorial para desenvolver medicamentos com propriedades antiinflamatórias (Hardaman et al., 1996). A introdução da Indometacina como agente antiartrítico há cerca de duas décadas (em 1963) marcou o começo de uma nova direção das pesquisas dos antiinflamatórios (Silva, 1998).

Pó cristalino, amarelo castanho ou amarelo pálido, praticamente insolúvel em água, sensível a luz solar e soluções alcalinas, a indometacina é obtida a partir do ácido 2-metil-5-metoxiindolacético (Korolkovas e Burckhalter, 1988) (Figura 1).

A indometacina tem propriedades analgésico-antipiréticas e antiinflamatórias marcantes. Os efeitos antiinflamatórios da indometacina são evidenciados nos pacientes com artrite reumatóide, gota aguda, espondilite anquilosante e osteoartrite do quadril, mostrando-se também eficaz em afecções inflamatórias extra-articulares, como pericardite e pleurite, e na síndrome de Batter (Katsung, 1994). A indometacina tem propriedades analgésicas independentes dos seus efeitos antiinflamatórios e existem evidências indicando que este medicamento tenha ações central e periférica (não é indicada para uso geral como analgésico) (Hardaman et al., 1996).

A indometacina alivia a dor, reduz inflamação e o edema das articulações, aumenta a força da preensão palmar e reduz a duração da rigidez matutina (Hardaman et al., 1996).

As prostaglandinas tem sido envolvidas na manutenção da permeabilidade do canal arterial e a indometacina e agentes semelhantes tem sido usados nos recém-nascidos para fechar o canal arterial, quando ele ainda estiver aberto. A liberação das prostaglandinas pelo endométrio durante a menstruação pode causar cólicas fortes e outros sintomas de desmenorréia primária; o tratamento deste distúrbio com AINE tem conseguido sucesso considerável (Hardaman et al., 1996).

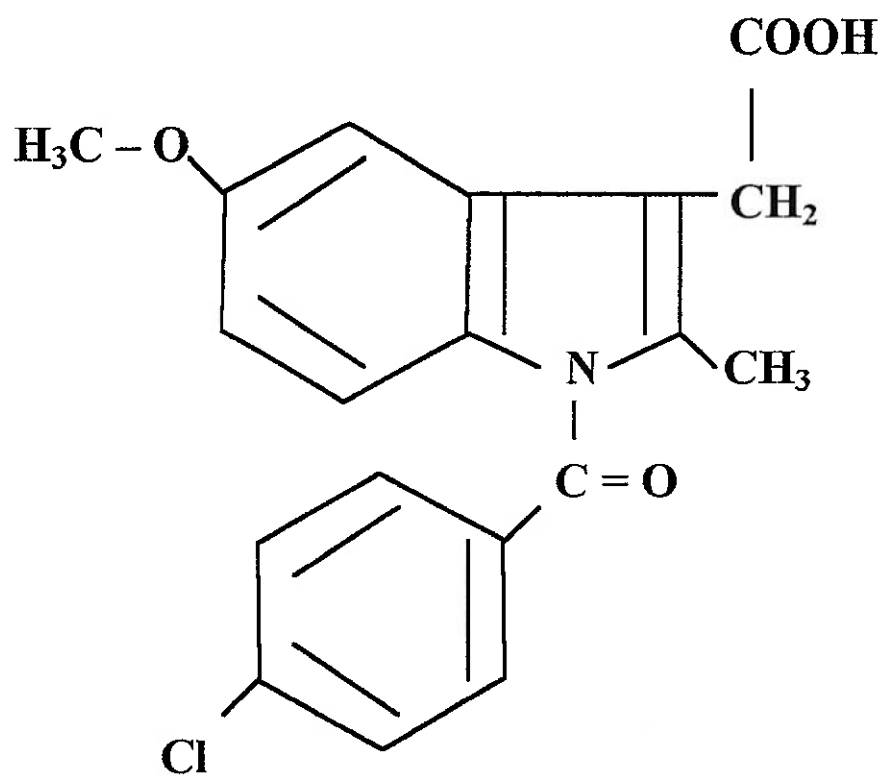


Figura 1: Estrutura química da indometacina

A indometacina inibe a biossíntese de prostaglandinas, cuja ação pode ser a base do seu efeito antiinflamatório e antipirético. Desacopla a fosforilação oxidativa na mitocôndria hepática e cartilaginosa e inibe a motilidade de leucócitos polimorfonucleares. A sua ação antiflogística não depende da estimulação adrenocortical (Zanine, 1989).

A indometacina tem pelo menos uma indicação em obstetrícia, podendo ser usada com agente tocolítico para suprimir as contrações uterinas das mulheres com parto prematuro (Hardaman et al., 1996).

A incidência e gravidade dos efeitos colaterais da indometacina podem limitar sua utilidade terapêutica; entretanto, como os efeitos colaterais deste medicamento parecem ser mais toleráveis quando ele for ingerido a noite, um método útil de aproveitar a eficácia da indometacina e reduzir seus efeitos colaterais é administrar uma dose grande única (até 100 mg) à hora de deitar, talvez junto com outros AINEs melhor tolerados (Hardaman et al., 1996).

1.2.1. FARMACOCINÉTICA E METABOLISMO

A indometacina é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal após administração oral; 90% da indometacina ligam-se às proteínas plasmáticas e a droga liga-se ainda amplamente aos tecidos (Hardaman et al., 1996; Katsung; 1994; Zanine, 1989). O pico de concentração plasmática é alcançado em 2 horas no indivíduo em jejum, mas pode ficar retardado, em algum grau, quando a droga é ingerida após refeições (Hardaman et al., 1996; Silva, 1998). A biodisponibilidade oral da droga, após administração de doses terapêuticas, é de 98%. O volume de distribuição da indometacina é de 0,26 litro/Kg e a meia-vida é de 2,4 horas, aumentando em pacientes com neoplasia e em prematuros (Silva, 1998).

As concentrações plasmáticas necessárias para obter efeito antiinflamatório não foram determinadas com precisão, porém provavelmente estão abaixo de 1 µg/ml. As concentrações plasmáticas no estado de equilíbrio, depois da administração prolongada, são de cerca de 0,5 µg/ml (Hardaman et al., 1996).

A indometacina se distribui em muitos tecidos, inclusive no líquido sinovial de pacientes artríticos, onde o pico de concentração aparece cerca de uma hora após o pico plasmático. O equilíbrio entre o plasma e o líquido sinovial é estabelecido em cerca de 3 horas após a única dose. A concentração sinovial cai mais lentamente nas 4 horas seguintes do que no plasma e da quinta até a nona hora a concentração encontrada é ligeiramente mais elevada que no plasma (Silva, 1998).

A indometacina é em grande parte metabolizada no fígado, sendo convertida em metabólitos ativos, incluindo aqueles formados por O-desmetilação (cerca de 50%), conjugação com o ácido glicurônico (cerca de 10%) e N-desacilação (Hardaman et al., 1996; Silva, 1998). Alguns destes metabólitos são detectáveis no plasma e compostos metabólicos livres e conjugados são eliminados pela urina, bile e fezes. Há circulação entero-hepática dos conjugados e provavelmente da própria indometacina. Cerca de 10 a 20% do medicamento são excretados de forma inalterada na urina, em parte pela secreção tubular (Hardaman et al., 1996).

1.2.2. INTERAÇÕES FARMACOLÓGICAS

As concentrações plasmáticas totais da indometacina e desses metabólitos inativos são aumentados pela administração concomitante da probenecida, talvez devido à redução da secreção tubular da indometacina (Hardaman et al., 1996; Silva, 1998). Alguns estudos indicam que a indometacina não modifica o efeito dos agentes anticoagulantes orais. Contudo, a administração simultânea poderia ser perigosa devido ao risco aumentado de sangramento gastrointestinal (Hardaman et al., 1996).

A incidência de efeitos colaterais gastrintestinais foi significativamente mais elevada com a terapia concomitante com o ácido acetilsalicílico. O uso associado de indocid e diflunisal foi associado a hemorragia gastrointestinal fatal. Tem sido relatado que o indocid diminui a secreção tubular de metotrexato e potencializa sua toxicidade. Quando a indometacina e lítio são administrados simultaneamente, o paciente deve ser cuidadosamente observado quanto aos

sinais de toxicidade do lítio. A administração de AINEs concomitantemente com a ciclosporina tem sido associada ao aumento da toxicidade induzida pela ciclosporina, possivelmente atribuída a um decréscimo da síntese renal da prostaciclina. Indocid utilizado concomitantemente com a digoxina, tem sido reportado aumentar a concentração de digoxina no soro e aumento de sua meia vida. A co-administração de indocid e alguns agentes anti-hipertensivos tem resultado em atenuação aguda do efeito hipotensivo destes últimos, atribuída, pelo menos em parte, a inibição da síntese de prostaglandinas pela indometacina (Ache, 2000).

1.2.3. REAÇÕES ADVERSAS E TOXICIDADE

Uma percentagem muito alta (35 a 50%) dos pacientes que usam as doses terapêuticas convencionais da indometacina desenvolvem sintomas indesejáveis e cerca de 20% precisam interromper o tratamento. A maioria dos efeitos colaterais está relacionada à dose usada (Hardaman et al., 1996). Em virtude da alta incidência e da gravidade dos efeitos colaterais seu uso muitas vezes é limitado – especificamente no trato gastrointestinal (diarréia, hemorragia, pancreatite, dor abdominal), como também no fígado, rim, baço, sangue e medula (Rang et al., 1997). Irritação local resultante da droga administrada por via oral permite a difusão retrógrada de ácido para a mucosa gástrica e induz lesão tecidual, podendo estes efeitos estarem relacionados com a inibição da síntese das prostaglandinas gástricas, em especial PGI_2 e PGE_2 , as quais inibem a secreção ácida gástrica, promovendo a secreção de um muco citoprotetor pelo intestino e quando inibida podem fazer com que o estômago torne mais susceptível à lesão (Hardaman et al., 1996).

Dose terapêutica de Indometacina (50 mg) causa um aumento significativo de histamina e secreção de pepsina, uma diminuição da produção de bicarbonato, a supressão de agregação de plaquetas ADP-induzida e atividade antiagregacional do epitélio vascular, e intensificação da fibrinólise às custas da ativação da sua primeira fase. Estes efeitos determinados pelo bloqueio de ciclooxigenase (prostaglandinas), pode contribuir para o desenvolvimento de lesão ulcerativa hemorrágica da mucosa gastroduodenal (Fisher et al., 1987).

Em 20-25% dos pacientes ocorre efeitos colaterais no sistema nervoso central associado a indometacina como cefaléia intensa que pode estar associada a tontura, vertigem, fadiga, confusão e depressão. Em raros casos, foi relatado o aparecimento de psicose com alucinações. As anormalidades hepáticas – hepatite e icterícia – são observadas com rara frequência. Vasoconstrição coronariana, hipercalemia relacionada com a inibição da síntese de prostaglandinas no rim. As reações hematológicas incluem trombocitopenia, neutropenia, anemia aplásica (Ache, 2000; Katsung, 1994).

A Indometacina provoca inibição da agregação plaquetária, inibe a ciclooxigenase plaquetária pelo fato de impedir a formação da TXA_2 o que explica a tendência em prolongar o tempo de sangramento e inibição da motilidade dos leucócitos polimorfonucleados (Brody et al., 1990).

A estimulação das plaquetas para agregar leva à ativação das fosfolipases de membrana com a conseqüente liberação do araquidonato e da sua transformação em endoperóxidos das prostaglandinas em TXA_2 . Tais substancias induzem a agregação plaquetária, uma vez, por exemplo, a trombina agrega as plaquetas, sem a liberação do araquidonato. A importância da via do tromboxano está implicada no fato de que a indometacina inibe a segunda fase da agregação plaquetária e induzem um pequeno defeito hemostático nos seres humanos (Hardaman et al., 1996).

Visão embaçada, diplopia, dor orbital e periorbital podem ocorrer infreqüentemente. Depósitos corneanos e distúrbios retinianos, inclusive o da mácula, tem sido relatados em alguns pacientes com artrite reumatóide sob terapia prolongada com indocid. Zumbidos, distúrbios auditivos e raramente surdez tem sido relatados. Proteinúria, síndrome nefrótica, nefrite intersticial e insuficiência renal, são raramente relatados (Ache, 2000).

Estudos recentes tem mostrado que 70% dos pacientes que ingerem por longo tempo fármacos antiinflamatórios não-esteróides desenrolam ileites crônicas e outras complicações graves como síndrome de malabsorção, perfuração, hemorragia e oclusão intestinal, podendo levar a um choque séptico (Soriano Rosas et al., 1998).

1.2.4. CONTRA-INDICAÇÕES

Processos psiquiátricos, epilepsia e parkinsonismo podem ser agravados pelo uso da indometacina, não sendo indicados nessas condições clínicas. Contra-indicado também em gestantes, lactentes, pacientes com doenças renais e lesões ulcerativas no estômago ou duodeno (Silva, 1998). Insuficiência renal, enterocolite, trombocitopenia ou hiperbilirrubinemia contra-indicam o uso de indometacina (Brody et al., 1997). É contra-indicada em pacientes com crises asmáticas agudas, urticária ou rinite precipitadas pelo ácido acetilsalicílico ou outro antiinflamatório não-esteróide (Ache, 2000).

1.2.5. INDOMETACINA E SEPSIS

O choque séptico pode ser causado por varias situações de agressão ao organismo, incluindo hemorragia, infecções bacterianas, queimaduras e dano miocárdio agudo. Pode haver hipovolemia causada diretamente por perda de sangue ou por movimento de líquidos do plasma para os tecidos. A resposta fisiológica a esta situação é complexa: ocorre uma vasodilatação no leito vascular de um órgão vital que é vantajosa por favorecer a perfusão do órgão, mas as expensas de uma maior redução na pressão sangüínea, o que leva à reduzida perfusão do órgão (Rang et al., 1997).

O choque séptico decorre da disseminação de micróbios a partir de infecções localizadas graves (ex., abscessos, peritonite, pneumonia) para a corrente sangüínea. A maioria dos casos é causada por bacilos Gram-negativos produtores de endotoxinas (são lipossacarídeos (LPS) da parede bacteriana, que consistem em um componente central tóxico de lipídeo A e em um revestimento polissacarídico complexo), mas também por bactérias Gram-positivas e, ocasionalmente, por fungos. Os mediadores têm sido implicados como causadores do choque, e incluem os seguintes: citocinas (IL-1, TNF, IL-6, IL-8), PAF, óxido nítrico, complemento (C5a e C3a), prostaglandinas, leucotrienos, sistema cinina, metabólitos do oxigênio, catecolaminas, endorfinas e fator depressor miocárdico (Cotran et al., 1996).

Entretanto, fica nítido que a ativação mediada pelas endotoxinas do sistema fagócito mononuclear e a conseqüente liberação de IL-1 e TNF- α é um evento crucial na patogenia do choque séptico. Estas citocinas geram ativação endotelial e adesão e agregação leucocitárias, além de promoverem a coagulação intravascular e a trombose capilar. Além disso, sinalizam para mediadores secundários, que incluem as prostaglandinas, o fator ativador plaquetário e o óxido nítrico. Este último, por sua vez, causa vasodilatação e outros efeitos pró-inflamatórios. Além de causarem a liberação de mediadores biologicamente ativos, as toxinas bacterianas geram também lesão direta às células e tecidos (Cotran et al., 1996).

Vários estudos mostraram o papel patogênico da flora bacteriana na formação de lesões intestinais induzida pela indometacina. A administração de indometacina (10 mg Kg⁻¹) s.c. causou lesões hemorrágicas no intestino delgado, principalmente jejuno e íleo. As primeiras lesões foram observadas 6 horas após administração o que aumenta progressivamente no tempo de 24 horas depois (Konaka et al., 1999). Recentemente mostrou a importância do óxido nítrico (NO) na ocorrência de injúria microvascular no jejuno de ratos causado pela indometacina (Konaka et al., 1999).

O envolvimento do NO formado pela isoforma iNOS tem sido investigado no desenvolvimento de lesões intestinais provocadas pelo uso contínuo de indometacina. Sobre o período de 72 h, a indometacina (10 mg Kg⁻¹, s.c.) provocou um aumento tempo dependente na expressão do iNOS e aumentou o vazamento vascular da albumina humana no jejuno após 18 h de aplicação de indometacina (Evans et al., 1999).

A inibição da via do fator tissular tem sido mostrado como atenuante de ativação da coagulação e para prevenir a morte na bacteremia gram-negativa como modelo primário de sepsis (Jonge et al., 2000).

Durante o choque endotóxico observou-se aumento nos níveis de prostaglandinas circulantes em vários modelos de animal, mas o papel preciso delas ainda não está estabelecido. A descoberta de um potente metabólito do ácido araquidônico, vasoativo – isto é a TXA₂, um vasoconstrictor e iniciador de agregação de plaquetas, e prostaciclina, um vasodilatador e inibidor da agregação

plaquetária – estimulou interesse no potencial deles como mediadores de muitas seqüelas patofisiológicas do choque endotóxico (Fletcher et al., 1982).

Subsequente estudos tentaram discernir quais metabólitos do ácido araquidônico são potencialmente prejudiciais no choque. Os resultados demonstram que a tromboxane A₂, um potente agregante plaquetário e vasoconstrictor, aumenta precocemente durante choque endotóxico em ratos (Cook et al., 1979).

Vários estudos tem mostrado que uma proporção alta de pacientes com icterícia obstrutiva tem endotoxemia sistêmica e isto se correlataram bem com a evidência do catabolismo de fibrinogênio e níveis elevados no soro de produtos de degradação de fibrina (Fletcher et al., 1982).

1.3. BETAMETASONA

Em 1931, Swingle e Pfiffner conseguiram preparar, pela primeira vez, um extrato córtico-supra-renal ativo, no qual foram identificados posteriormente quase meia centena de compostos químicos intimamente relacionados entre si, pertencentes ao grupo químico dos esteróides. De todos esses compostos, poucos se mostraram fisiologicamente ativos, sendo a maioria constituída de precursores ou produtos de degradação dos hormônios atuantes (Craig, 1986).

O córtex da supra-renal sintetiza duas classes de esteróides: os corticosteróides (glicocorticóides e mineralocorticóides), que possuem 21 átomos de carbono, e os androgênios, que apresentam 19. Historicamente, as ações dos corticosteróides foram descritas como glicocorticóides (reguladoras do metabolismo de carboidratos) e mineralocorticóides (reguladoras do equilíbrio eletrolítico). Os corticosteróides da supra-renal diferem em suas atividades glicocorticóides e mineralocorticóides relativas (Hardaman et al., 1996). Os corticosteróides, bem como os demais hormônios de natureza esteróide formam-se a partir do colesterol, existindo entre tais hormônios íntimas e múltiplas relações recíprocas, o que explica a coexistência em muitos deles de atividades fisiológicas comuns (Craig, 1986).

Os efeitos dos corticosteróides são numerosos e amplos. Seus diversos efeitos incluem: alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico; e preservação da função normal do sistema cardiovascular, do sistema imunológico, do rim, da musculatura esquelética, do sistema endócrino e do sistema nervoso (Hardaman et al., 1996).

Os glicocorticóides caracterizam-se do ponto de vista químico pela presença de um grupo oxidrila em posição 11 e outro em posição 17, sendo este último essencial à atividade antiflogística (daí esses hormônios serem chamados de 17-hidrocorticosteróides) (Craig, 1986).

A betametasona é um glicocorticóide sintético obtido mediante a afixação de um grupo metílico em posição 16-beta na molécula da fluorprednisolona. Pertence, juntamente com a parametasona e dexametasona, ao grupo de derivados de ação longa, isto é, com meia-vida biológica superior a 48 horas. É considerada como possuidora de potência equivalente à da dexametasona (Craig, 1986).

1.3.1. MECANISMO DE AÇÃO

Várias hipóteses foram aventadas para explicar o mecanismo de ação dos hormônios corticóides. De fato, atualmente a ação estimulante e regulatória dos hormônios esteróides – sexuais e antiinflamatórios – sobre a síntese protéica é explicada como sendo mecanismo bifásico, que compreende complexações altamente específicas aos níveis citoplasmático e cromatinico (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

Na primeira fase, os hormônios ligam-se a moléculas receptoras presentes exclusivamente no citoplasma de célula-alvo (responsáveis pela resposta ao estímulo hormonal). Uma vez ligados aos hormônios, tais receptores são "ativados", migrando para o núcleo celular. Inicia-se então a segunda fase do mecanismo: a ligação dos complexos hormônio-receptor a sítios aceptores específicos localizados na assim chamada fração AP₃, componente da porção protéica não-histônica da cromatina. A segunda dissocia-se em seguida e passa a

interagir com o sítio de iniciação da transcrição genética do DNA. Desta forma, permite à RNA-polimerase iniciar a montagem do mRNA correspondente à proteína, cuja síntese é estimulada pelo esteróide (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

Até o presente não se esclareceu, todavia, o mecanismo pelo qual tal estimulação é interrompida, mas parece possível que o processo exija a participação de enzimas (recentemente isolou-se a 5α -redutase, responsável pela transformação da progesterona em diidroprogesterona, inativa). Aparentemente, as moléculas receptoras não são afetadas e retornam ao citoplasma para dar seqüência ao ciclo (Korolkovas e Burckhalter, 1988).

1.3.2. Usos CLÍNICOS

Com exceção da terapia de reposição nos estados de deficiência, o uso dos glicocorticóide e, em grande parte, empírico. Com base na extensa experiência clínica, numerosos princípios terapêuticos podem ser propostos. Em primeiro lugar, dadas a quantidade e a gravidade dos efeitos colaterais potenciais, a decisão de instituir a terapia com glicocorticóide sempre requer uma cuidadosa consideração dos riscos e benefícios relativos em cada paciente (Hardaman et al., 1996).

Os glicocorticóides são usados atualmente com três objetivos principais: (a) substituir os hormônios endógenos (em presença de insuficiência adrenocortical); (b) inibir a excessiva secreção de corticotrofina (na síndrome adrenogenital); (c) restringir a atividade reacional dos tecidos) quando esta se mostra excessiva e inadequada) (Craig, 1986).

Os glicocorticóides exercem efeitos menores sobre a hemoglobina e o conteúdo eritrocitário sangüíneo, conforme evidenciado pela freqüente ocorrência de policitemia na Síndrome de Cushing e de anemia normocítica e normocrômica na doença de Addison. Efeitos mais profundos são notados no quadro da anemia hemolítica auto-imune, onde os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides podem diminuir a autodestruição dos eritrócitos. Os glicocorticóides aumentam os leucócitos polimorfonucleados circulantes em decorrência da liberação

aumentada da medula, diminuição da taxa de depuração a partir da circulação e desmarginação aumentada a partir das paredes vasculares (Hardaman et al., 1996).

Usados em alérgias e em condições inflamatórias onde os glicocorticóides inibem a produção de múltiplas células, de fatores que são críticos na geração da resposta inflamatória (Hardaman et al., 1996).

Os corticosteróides são empregados na quimioterapia da leucemia linfocítica aguda e em linfomas, por causa de seus efeitos antilinfocíticos. O uso na doença hepática tem sido altamente controvertido. A terapia com glicocorticóides está indicada em pacientes selecionados com doença inflamatória intestinal (colite ulcerativa crônica e doença de Crohn). São notadamente eficazes no tratamento de uma grande variedade de dermatoses inflamatórias. São valiosos na redução de edema cerebral associado a parasitas e a neoplasias, em especial as metastáticas (Hardaman et al., 1996).

1.3.3. FARMACOCINÉTICA E METABOLISMO

Os glicocorticóides são absorvidos ao nível sistêmico a partir dos locais de administração local, como nos espaços sinoviais, o saco conjuntival, a pele, trato respiratório (Hardaman et al., 1996), trato gastrointestinal (Craig, 1986). Após absorção, 90% ou mais do cortisol no plasma ligam-se, de maneira reversível, à proteína em circunstâncias normais (Hardaman et al., 1996). 10 a 25% de uma dose inalada oralmente se deposita na traquéia e brônquios. Início de ação rápida. A ligação a albumina e transcortina é alta (65%); Sofre biotransformação primeiramente hepática e parcialmente pulmonar. A velocidade de metabolização pode ser aumentada por indução das enzimas de metabolização, e pode estar diminuída em casos de insuficiência hepática (Silva, 1998). Meia vida plasmática: 3 a 4,5 horas. Meia vida biológica: 36 a 54 horas. Eliminada pela urina (Craig, 1986). Nem a excreção biliar nem a fecal têm importância nos seres humanos (Hardaman et al., 1996).

1.3.4. REAÇÕES ADVERSAS E TOXICIDADE

Duas categorias de efeitos tóxicos resultam do uso terapêutico dos corticosteróides: aqueles decorrentes da interrupção da terapia com esteróides e os resultantes do uso continuado de doses suprafisiológicas. Os efeitos colaterais de ambas as categorias comportam risco de vida e obrigam a uma criteriosa avaliação dos riscos e benefícios em cada paciente (Hardaman et al., 1996). A cessação da terapia da terapia com corticosteróide envolve várias decisões difíceis. É importante lembrar que o problema mais frequente na abstinência esteróide é a reativação da doença básica. Existem várias complicações associadas à interrupção de esteróides: febre, mialgias, artralgias, indisposição entre as quais a mais grave é a insuficiência supra-renal aguda (Hardaman et al., 1996).

Com o uso contínuo de doses suprafisiológicas de corticosteróides pode levar a hipertensão, catarata, parada do crescimento e distúrbios de comportamento, suscetibilidade aumentada à infecção, osteoporose, miopatia, hábito peculiar da superdosagem de esteróides, que compreende a redistribuição do tecido adiposo estrias, equimoses, acne e hirsutismo (Hardaman et al., 1996).

Outras reações são observadas como: reações gastrintestinais, osteoporose, agravamento do diabetes, euforia, insônia, aumento de apetite, nervosismo, acne, distúrbios menstruais, aumento de peso, cefaléia, hipertensão, impotência, vertigem, psicoses, redução do nível de defesa contra infecções, Síndrome de *Cushing* iatrogênica (uso continuado de doses elevadas de corticosteróides) (Hardaman et al., 1996).

1.3.5. INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Podem diminuir os efeitos dos diuréticos vice-versa; álcool ou analgésicos antiinflamatórios não-esteróides podem aumentar o risco de ulceração gastrintestinal ou hemorragia; antiácidos podem diminuir seus efeitos farmacológicos; efedrina, fenitoína, fenobarbital, podem aumentar a depuração metabólica dos adrenocorticóides; Medicamentos ou alimentos que contém sódio

podem causar edema e aumento da pressão arterial. Vacinas com vírus atenuado ou outras imunizações podem potencializar a replicação do vírus da vacina, aumentando assim o risco do paciente de desenvolver a doença viral e/ou diminuir a capacidade de formação de anticorpos, por parte do paciente (Hansten, 1989).

1.4. CINEOL

O 1,8 Cineol, Cineol, Eucaliptol ou Cajepol tem peso molecular de 154,3 ($C_{10}H_{18}O$), incolor, com odor sugestivo de cânfora, principal constituinte de uma variedade de óleos essenciais (Santos, 1999). É um óxido terpenóico presente em muitas plantas de óleos essenciais que exibiu efeito inibitório em alguns tipos de inflamação experimental em ratos (Santos e Rao, 2000).

É considerado não tóxico e não irritante, porém o óleo de eucalipto, cujo maior constituinte é o cineol, provocou alguns incidentes de intoxicações em crianças nos Estados Unidos (Santos, 1999).

1.4.1. Usos

É largamente empregado em preparações farmacêuticas de uso interno e externo, serve como estimulante da expectoração nos casos de bronquite (Juergens et al, 1998) e age como anestésico local suave e anti-séptico no tratamento de inflamações da boca e garganta. Utilizado também em "sprays" para ambientes e cosméticos (Santos, 1999).

Em ratos aumenta a atividade das enzimas hepáticas, mas a importância em humanos não é clara. É capaz de aumentar a atividade metabólica de drogas quando administrado por inalação (por mecanismo não esclarecido), aumenta a absorção percutânea de preparações farmacêuticas, possui atividade antipirética e sedativa, aumenta atividade locomotora, possui papel direto na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, assim como na polinização (Santos, 1999).

1.4.2. FARMACOCINÉTICA

É bem absorvido a partir do ar inspirado, com um pico de concentração plasmática após aproximadamente 18 minutos, sendo sua eliminação sangüínea bifásica, com uma meia-vida de distribuição de 6,7 min e uma meia vida de eliminação de 104,6 min (Jager et al, 1996).

1.4.3. TOXICIDADE

A dose tóxica leva a sonolência em poucos minutos, e o paciente pode ficar inconsciente dentro de 15 minutos. Existem três principais manifestações da intoxicações: um efeito depressivo, respiração anormal e constrição pupilar. Outros sintomas incluem, dor epigástrica, fraqueza nas pernas e dores de cabeça. A morte ocorre após a ingestão de 30 ml de óleo, sendo demonstrados severos efeitos cardiovasculares, respiratório e SNC, porém um garoto de 3 anos sobreviveu a ingestão de aproximadamente 10 ml do óleo de eucalipto e um adulto sobreviveu após a ingestão de 60 ml (Santos, 1999).

1.5. SISTEMA DE COAGULAÇÃO

É um processo dinâmico de reações bioquímicas e enzimáticas envolvendo proteínas plasmáticas com atividade de proteases, lípidos e íons, que transformam o sangue circulante, fluido, em um gel insolúvel pela conversão do fibrinogênio em fibrina (Verrastro et al., 1996), muito embora a fibrina propriamente dita só corresponda a 0,15% do total do coágulo sangüíneo (Rang et al., 1997). Muitas informações ligadas à coagulação normal foram obtidas do estudo de pacientes e animais com deficiência hereditária dos vários fatores de coagulação (Lee et al., 1998).

A ativação consiste em uma proteólises parcial da molécula, pela qual se expõe um núcleo ativo, "serina", que se outorga uma capacidade enzimática (serino proteases), que permite ativar outro fator da coagulação. Esta ativação em

forma seqüencial (em cascata), amplifica a reação enzimática (Grupo Clath, 1990). Cada reação da via de coagulação resulta da agregação de um complexo reacional composto de uma enzima (fator de coagulação ativado), de um substrato (forma pró-enzima de um fator de coagulação) e um co-fator (acelerador de reação). Estes componentes são agregados sobre uma superfície fosfolipídica e mantidos coesos por íons cálcio. Assim, a coagulação tende a manter-se localizada em regiões onde é possível a ocorrência desta agregação, como por exemplo, na superfície de plaquetas ativadas (Cotran et al., 1996).

É costume dividir o esquema de coagulação sanguínea em vias extrínseca e intrínseca, ambas as quais convergem para o ponto onde o fator X é ativado. A via intrínseca é disparada *in vitro* pela ativação por contato do fator de Hageman (fator XII), que converte o fator VII em VIIa. Entretanto, existem evidências que a via intrínseca tem uma importância fundamental *in vivo* uma vez que pacientes com deficiência do fator XII não apresentam sangramentos anormais. Além disso, atualmente está claro que o fator tecidual também desempenha um papel na ativação da via intrínseca, uma vez que o complexo fator VIIa-fator tecidual também é capaz de converter o fator IX em IXa (Cotran et al., 1996).

i Os fatores de coagulação podem agrupar-se como se segue:

1. Fatores de contato: XI, XII, precalicreína, cininogênio;
2. Fatores vitamina K-dependentes: II, VII, IX, X;
3. Fatores sensíveis a trombina: I, V, VIII:C, XIII;

O sistema intrínseco contém todos os fatores necessários a coagulação e que se acham presentes no sangue circulante. O sistema extrínseco inclui a lipoproteína denominada tromboplastina tecidual (FIII), que os tecidos lesados liberam para o sangue circulante (Katsung, 1994).

1.5.1. FATORES DA COAGULAÇÃO

O fígado sintetiza todos os fatores da coagulação, incluindo o fator VIII (FVIII), quando também é produzido em diferentes tecidos, como plaquetas,

megacariócitos e células endoteliais. O Fator XIII (FXIII) parece ser encontrado também nos megacariócitos e plaquetas. Os fatores dependentes da Vit K a requerem para que seja completa a sua síntese no fígado (Verrastro et al., 1996).

1.5.1.1. FATORES VITAMINA K-DEPENDENTES

Tem como característica química a carboxilação de resíduos do ácido glutâmico, formando-se resíduos do ácido carboxiglutâmico, os quais são necessários para ligação de uma proteína a um fosfolípide, servindo os íons Ca^{2+} de pontes, fato que permite a atuação desses fatores na coagulação. Na deficiência de Vit K, ou quando há inibição da mesma por anticoagulantes cumarínicos, não ocorre ativação dos fatores, formando-se proteínas sem efeito coagulante, as quais não são capazes de se ligar aos íons Ca^{2+} (Lorenzi, 1999).

FATOR II – PROTROMBINA

É uma glicoproteína com peso molecular de 70.000 dáltons, vida média de 1000 horas e concentração no plasma de cerca de 100-150 $\mu\text{g/ml}$. Quando essa concentração cai abaixo de 40%, surgem alterações da hemostasia. Sua forma ativa é a trombina, cuja transformação envolve reações enzimáticas que se processam em cadeia. Tem como inibidor a antitrombina III (ATIII) (Lorenzi, 1999).

FATOR VII – PROCONVERTINA

É uma enzima que funciona juntamente com o fator tissular na via extrínseca da coagulação (Lee et al., 1998). Tem peso molecular de 55.000 dáltons, vida média de 15 horas e concentração no plasma de 1 $\mu\text{g/ml}$. Existe também no soro. É ativa até uma concentração mínima de 10%. Também é capaz de ativar o fator IX e seria, inclusive, capaz de iniciar o mecanismo da coagulação; possui a característica de não precisar ser ativado por proteólise (Lorenzi, 1999).

FATOR IX – FATOR CHRISTMAS

Proenzima envolvida na via intrínca da coagulação (Lee et al., 1998). Tem peso molecular 57.000 dáltons, vida média de 20 horas e concentração plasmática de 4µg/ml. Também pode ser encontrado no soro. Sua atividade persiste ainda quando há redução de até 20% da concentração (Lorenzi, 1999).

FATOR X – STUART-POWER

Com peso molecular de 59.000 dáltons, é uma glicoproteína de vida média de 65 horas e concentração no plasma em torno de 5µg/ml. Ocorre também no soro, sendo ativo até uma concentração mínima de 20%. É ativado pelo complexo IXa + VIIIa + Ca⁺⁺ + fosfolípidos, assim como pelo fator VIIa + fator tissular; nesse ponto as vias intrínseca e extrínseca da coagulação seguem um caminho comum (Lorenzi, 1999).

PROTEÍNA C

Glicoproteína de peso molecular de 62.000 dáltons, formada no fígado. Age como anticoagulante e tem ação estimulante sobre a fibrinólise. A proteína C só é ativada pela trombina quando está ligada a outra proteína – trombomodulina (Lorenzi, 1999).

PROTEÍNA S

É um co-fator da proteína C. Intensifica a ação anticoagulante da proteína C ativada. Também são denominadas *proteínas reguladoras da coagulação* (Lorenzi, 1999).

1.5.1.2. FATORES DE CONTATO

FATOR XII – FATOR DE HAGEMAN

É uma glicoproteína de cadeia simples, com peso molecular baixo (80.000), encontrada no plasma e no soro. Sua ativação não está totalmente esclarecida, sendo sua atividade localizada na cadeia leve da molécula (PM=28.000) (Lorenzi, 1999). É ativado por contato com superfícies estranhas, é um importante participante da via intrínseca da coagulação e em outros processos defensivos (Lee et al., 1998).

FATOR XI – ANTECEDENTE TROMBOPLÁSTICO DO PLASMA (PTA)

É uma glicoproteína com atividade de serina protease, com peso molecular de 160.000 dáltons, cuja atividade localiza-se na cadeia leve. O fator XI circula no plasma, ligado ao cininogênio de alto peso molecular (HMWK), formando um complexo. Atua num ponto importante da coagulação: a ativação do fator IX (Lorenzi, 1999).

FATOR FLECHER – PRECALICREÍNA

É uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 85.000 dáltons; é convertida em calicreína pelo fator XIIa, a qual, por sua vez, é capaz de ativar o fator XII. Circula, formando um complexo com o cininogênio de alto peso molecular; outra função importante da calicreína é a ativação da pró-renina em renina (Lorenzi, 1999).

FATOR FITZGERALD – CININOGENIO DE ALTO PESO MOLECULAR (HMWK)

É um polipetídio com peso molecular de 110.000 dáltons que circula no plasma, formando um complexo com o fator XI ou com a calicreína; É considerado um transportador de proteínas de atividade coagulante e atua na

coagulação, intensificando as reações que se processam nas superfícies lesadas (Lorenzi, 1999).

1.5.1.3. FATORES SENSÍVEIS A TROMBINA

Esses fatores tem peso molecular alto e são consumidos durante a coagulação, por isso não são encontrados no soro.

FATOR V – PROACELERINA

Peso molecular cerca de 330.000 dáltons, sendo encontrado nos grânulos alfa das plaquetas e no plasma. Níveis mínimos de atividade é de 10-15% de concentração plasmática. Tem como inibidor natural a proteína C. É co-fator do fator Xa e facilita o acúmulo do fator X na membrana plaquetária (Lorenzi, 1999).

FATOR VIII – COMPLEXO FATOR VIII/vWF

É um complexo glicoprotéico formado por dois componentes: (1) fator VIII coagulante ou VIII:C ou fator anti-hemofílico – tem baixo peso molecular, é ativado pela trombina e inativado pela plasmina – e (2) fator vWF ou fator von Willebrand – peso molecular muito maior, atua na fase de hemostasia primária, só é parcialmente inativado pela plasmina e pode ser detectado no soro (Lorenzi, 1999).

Os dois componentes circulam no plasma unidos por ligações não covalentes. Não se sabe com certeza o local de formação do VIII:C, admitindo-se que seja sintetizado no fígado e no endotélio. O vWF é produzido pelas células endoteliais e pelos megacariócitos, ficando armazenado tanto nas células endoteliais como nos grânulos alfa das plaquetas (Lorenzi, 1999).

A deficiência do fator VIII:C é encontrada na hemofilia A e a do vWF na doença de von Willebrand. Quando há deficiência do vWF, a agregação plaquetária em presença da ristocetina (antibiótico que estimula a agregação plaquetária *in vitro* na presença de vWF) fica comprometida (Lorenzi, 1999).

FATOR XIII – FATOR ESTABILIZADOR DA FIBRINA

Age na formação de pontes covalentes entre monômeros de fibrina. Atua também sobre a fibronectina, proteína presente no plasma, no tecido conjuntivo e nas células endoteliais. O fator XIII promove a ligação da fibrina ao colágeno através da ação de moléculas de fibronectina. Ao contrário das demais enzimas da coagulação que tem a atividade de serina protease, o fator XIIIa é uma transamidase. Ele é importante para a formação de um coágulo firme e estável (Verrastro et al., 1998).

FIBRINOGENIO (FATOR I)

O fibrinogênio, fator de coagulação mais abundante e que forma o coágulo de fibrina (Henry, 1999), é uma proteína plasmática, de alto peso molecular (320.000 – 400.000 dáltons), cuja molécula forma 3 globos, unidos entre si por estruturas filamentosas enoveladas (Câmara, 1998).

Os componentes químicos do fibrinogênio são aminoácidos, carboidratos e várias pontes dissulfídicas, que tem papel importante na polimerização da fibrina, a qual constitui a base física de todos os coágulos sangüíneos e fornece a estrutura para a rolha hemostática permanente (Lee et al., 1998).

O fibrinogênio não só é um dos 3 principais componentes das vias da coagulação, como também é um componente chave na agregação plaquetária. Parte do fibrinogênio é efetivamente derivado das plaquetas (Rang et al., 1997).

A taxa de fibrinogênio no plasma é de aproximadamente 160 a 415 mg/dl (Lee et al., 1998), valor crítico <80 mg/dl e >700 mg/dl (Wallach, 1999). Assim, aumenta em resposta a uma série de estresses, como traumas, inflamações, endotoxinas e na gestação (Lee et al., 1998).

Os níveis de fibrinogênio se tornam elevados com outros reagentes da fase aguda, ocasionalmente acima de 1,0 g/l. Em tais circunstâncias, a sedimentação eritrocitária também apresenta-se acentuadamente elevada devido, diretamente, ao conteúdo de fibrinogênio (Henry, 1999). Níveis altos de

fibrinogênio tem aparecido como um fator de risco significativo para a trombose arterial e também provavelmente venosa. O fibrinogênio é uma proteína de reação da fase aguda e níveis elevados em condições obstétricas podem mascarar um consumo significativo na Coagulação Intravascular Disseminada (CID) complicando estas condições (Fundação Pró-Sangue, 2000). Os níveis de fibrinogênio também se elevam na gravidez e com uso de contraceptivos. Níveis baixos geralmente indicam uma ativação extensa da coagulação com consumo de fibrinogênio. Durante esse processo, o plasminogênio também é ativado em plasmina, a qual degrada a fibrina e o fibrinogênio em produtos separados que são determinados para a avaliação da coagulação intravascular (Henry, 1999). Está presente em menores quantidades na linfa e pode entrar na circulação via linfáticos hepáticos, entretanto, as plaquetas também o contêm acumulado em seus grânulos α (Lee et al., 1998).

O catabolismo de fibrinogênio ocorre continuamente e pode envolver a conversão do fibrinogênio em derivados solúveis de pesos moleculares menores em consequência da ação da plasmina. Esses derivados normalmente constituem 20% do fibrinogênio no plasma (Lee et al., 1998).

A taxa de produção do fibrinogênio pode aumentar muito como consequência de vários estímulos inespecíficos. Existem evidências indiretas de que os níveis plasmáticos de produtos de degradação de fibrinogênio, possivelmente atuando como um controle de retroalimentação, podem constituir um importante regulador da velocidade de síntese de fibrinogênio, mas essa hipótese foi questionada (Lee et al., 1998).

Anormalidades hereditárias do fibrinogênio incluem doenças qualitativas e quantitativas. Deficiência quantitativa são afibrinogenemia ou hipofibrinogenemia, dependendo da severidade, e as doenças qualitativas, incluem anormalidades estrutural da molécula, são denominadas disfibrinogenemia (Beutler et al., 1995).

Numerosas distúrbios hereditários do fibrinogênio (disfibrinogenemia) foram identificados, nas quais uma molécula funcionalmente anormal do fibrinogênio é sintetizada com uma seqüência alterada de aminoácidos devido à

mutação genética. Algumas disfibrinogenemias exibem comprometimento da coagulação e diátese hemorrágica e outras tendências a trombose (Henry, 1999).

A afibrinogenemia congênita, na qual basicamente não há síntese de fibrinogênio, acarreta um distúrbio hemorrágico, o qual, paradoxalmente, não é tão severo quanto as hemofilias em termos de anormalidades articulares secundárias à hemorragia (hemartroses) (Henry, 1999).

1.6. FIBRINÓLISE

O sistema fibrinolítico destina-se a destruir o excesso de fibrina formada e recanalizar os vasos quando a hemostasia se completa. O mecanismo fibrinolítico se processa em três fases: (a) formação do ativador do plasminogênio; (b) formação de plasmina; (c) formação dos fibrinopeptídeos. Assim, um pró-ativador, na presença de quinases tissulares ou bacterianas, é ativado, transformando-se no ativador do plasminogênio que o transforma em plasmina (Miller, 1999). A plasmina lisa o fibrinogênio e a fibrina resultando em produtos de degradação da fibrina e fibrinogênio (PDF) e também, é uma enzima limitante do processo trombótico e quando sua formação é deficiente, se favorece a possibilidade de trombose (Mazza, 1990).

A plasmina deriva do plasminogênio, que pode ser ativado fisiologicamente por 2 mecanismos: pelo ativador tissular do plasminogênio (t-PA) ou pela uroquinase e pelo sistema de contato, responsável de começar o mecanismo intrínseco da coagulação. Terapeuticamente também pode ser ativado pela estreptoquinase (Jandl, 1996).

Da sua ação sobre o fibrinogênio ou fibrina se geram, em forma sucessiva, vários fragmentos e peso molecular decrescente, PDF, que possuem diversas atividades biológicas, tais como inibir ou aumentar a agregação plaquetária, inibir a polimerização da fibrina, liberar fibrinogênio de seu sítio de síntese, etc.

O sistema fibrinolítico está implicado em múltiplos fenômenos biológicos, como por exemplo, inflamação e reparação do tecido, ovulação e

implantação embrionária, migração de leucócitos, metástases (Grupo Clath, 1990).

O processo de fibrinólise sofre variações fisiológicas com o stress, anoxia, estase, durante a gravidez e o puerpério, e sofre variações em estados patológicos. É constatado uma redução da atividade fibrinolítica em doentes com aterosclerose e trombose. É observado uma hiperfibrinólise sistêmica secundária a ativação direta (cirurgia de vias urinárias, sepsis por bactérias, veneno de taturana), podemos ainda observar um aumento da atividade fibrinolítica localizada (síndrome do coágulo retido em cavidades serosas, pleural, peritonal e pericárdica, em vias urinarias e no útero por distúrbios obstétricos) (Melo e Rosenfeld, 1999).

Diferente da coagulação, não existe um bom teste de screening para avaliar a função fibrinolítica. A suspeita é clínica e por alterações variáveis encontradas o coagulograma. A fibrina deve ser considerada como um elemento entre duas forças opostas: a que determina a sua formação e a que determina sua destruição.

O melhor método para avaliar a função fibrinolítica é a dosagem individual dos componentes fibrinolíticos (plasmina e plasminogênio) e a determinação dos produtos de degradação do fibrinogênio e fibrina (PDF e D-dímero).

PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DA FIBRINA E FIBRINOGENIO (PDF)

O aumento do PDF sérico pode ser decorrente de fibrinólise primária ou mais comumente secundária a processos de hipercoagulação. A presença de PDF no soro inibe a coagulação normal, interfere na polimerização da fibrina e interfere na função normal plaquetária. Essa inibição é evidenciada no alongamento do TP, TTPA, e principalmente tempo de trombina (TT) (Melo e Rosenfeld, 1999).

O PDF sérico em condições patológicas pode ser encontrado em CIVD aguda ou crônica, doenças vasculares oclusivas agudas, dano tecidual extenso, mordida de cobra, doenças malignas, complicações obstétricas, hemólise

intravascular aguda, reação transfusional, hipertermia, choque, hepatopatias severas, em doenças reumatológicas (Melo e Rosenfeld, 1999).

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliação dos efeitos do 1,8 cineol e betametasona sobre a toxicidade intestinal e aumento dos níveis de fibrinogênio induzido pela indometacina em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a toxicidade intestinal induzida pela indometacina em ratos.

Observar a presença de úlceras hemorrágicas induzidas pela indometacina em ratos.

Avaliar a presença de enterobactérias através da cultura do lavado peritoneal.

Avaliar alterações hemostáticas induzidas pela indometacina, 1,8 cineol e betametasona através de testes que avaliam o sistema de coagulação e fibrinolítico em ratos.

Constatar o aumento do fibrinogênio induzido pela lesão intestinal e o efeito do 1,8 cineol e betametasona sobre este aumento.

Avaliar o efeito da Indometacina sobre o número de plaquetas, bem como o efeito do 1,8 cineol e betametasona.

Avaliar uma possível toxicidade hepática da indometacina, 1,8 cineol e betametasona.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Ratos, machos (180 - 200 g), cedidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, mantidos em gaiolas-padrão de plástico à temperatura ambiente, com livre acesso a comida e água, separados conforme o grupo - grupo controle e grupo de animais de experimentação aos quais foram administrados, Indometacina (5 mg/Kg – Indocid®, v.o., 4 dias), Indometacina + 1,8 Cineol (5 mg/Kg + 400 mg/kg, v.o., 4 dias) e Indometacina + Betametasona (5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg, v.o., 4 dias).

Obtivemos o sangue dos animais (no quarto dia de tratamento), anestesiados com éter, através da punção do plexo orbital do olho, coletados em tubos contendo citrato de sódio a 3,8%. Após a coleta, o material foi devidamente identificado e levado imediatamente ao Laboratório de Hemostasia do HEMOCE para a realização dos exames: Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), Dosagem de Fibrinogênio, Contagem de Plaquetas, Dosagem do Fator XIII (FXIII) e Produtos de degradação de fibrinogênio e Fibrina (PDF). A análise da função hepática através das enzimas **ALT e γ -GT foi realizada no Laboratório do Hospital Universitário Walter Cantídio.** Após a coleta do sangue os animais foram sacrificados para consequente avaliação do lavado peritoneal, através da cultura microbiológica.

Antes do processamento da amostra, tivemos o cuidado de verificar a presença de qualquer indício de hemólise e/ou rede de fibrina, se encontrados, eliminamos o material para a obtenção de resultados confiáveis nos testes de coagulação. Para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), o sangue citratado foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos em centrifuga refrigerada a 8°C (Centrifuga Refrigerator FANEM® modelo FR15).

3.2. DROGAS

Indometacina – Indocid®

1,8 Cineol – Sigma - USA

Betametasona – Schwing

3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

GRUPOS	TRATAMENTO
1	Grupo controle
2	Indometacina - 5 mg/Kg, v.o., 4 dias
3	Indometacina + 1,8 Cineol - 5 mg/Kg + 400 mg/Kg, v.o., 4 dias
4	Indometacina + Betametasona - 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg, v.o., 4 dias

3.4. ESTUDO DA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE

3.4.1. TEMPO DE PROTROMBINA (TP)

Para a determinação do TP, foi utilizado o método de QUICK, o qual avalia a recalcificação do plasma na presença de um excesso de fosfolípidos (tromboplastina). Considerando que a protrombina é convertida em trombina num tempo uniforme, a recalcificação com quantidade conhecida de cloreto de cálcio produz a coagulação do plasma. O tempo, em segundos, é anotado desde a recalcificação até a coagulação é o tempo de protrombina. A prova determina a concentração de protrombina no sangue (Carvalho, 1999). O TP é dependente do sistema extrínseco de formação do complexo protrombínico (VII, V E X), da protrombina e fibrinogênio (Fundação Pró-Sangue, 2000). Os testes de cada

amostra foram realizados em aparelho semi-automático (Diagnóstica Stago ST4) no Laboratório de Hemostasia do HEMOCE.

A medição do TP com Tromborel® S constitui um screening-test rápido e sensível para detectar transtornos da coagulação no âmbito do sistema extrínseco (fatores II, V, VII e X). Devido ao seu alto grau de sensibilidade a estes fatores, tromborel é particularmente adequado para:

- regulação e controle da terapia anticoagulante por via oral;
- diagnóstico de deficiências congênitas de fatores do sistema extrínseco;
- diagnóstico de deficiências adquiridas dos fatores da coagulação;
- controle da atividade de síntese hepática em doenças do fígado (Dade, Behring Marburg, 1999).

O TP mostra-se aumentado nas deficiências do complexo protrombínico e do fibrinogênio, bem como na CIVD (Miller, 1999).

3.4.2. TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA)

O teste de determinação do TTPA (Platelin® LS) envolve a recalcificação do plasma, porém em presença de uma cefalina proveniente de um extrato etéreo de cérebro. A cefalina é uma lipoproteína. Funciona como um substituto das plaquetas, fornecendo uma concentração ótima de fosfolípide. Dessa forma, as reações do sistema intrínseco de coagulação são aceleradas (Organon Teknika, 1989). O TTPA corresponde ao tempo gasto para ocorrer a coagulação do plasma recalcificado em presença de um fosfolípide ou tromboplastina parcial (Carvalho, 1999).

É considerado um “screening-test” para detectar anormalidades no sistema intrínseco da coagulação. Pode utilizar para deficiências dos fatores II, V, VIII, IX, X, XI E XII), porém é insensível ao fator plaquetário 3. É sensível para detectar inibidores neutralizantes específicos, de interferência, como é o caso do anticoagulante lúpico, e para monitorização terapêutica de heparina (Fundação

Pró-Sangue, 2000). O teste pode não detectar leves defeitos da coagulação (25 - 40% dos valores normais), que às vezes causam sangramento significativo (Wallach, 1999).

Os exames de cada amostra foram realizados por aparelho semi-automático (Diagnóstica Stago ST4) no Laboratório de Hemostasia do Hemoce.

3.4.3. DOSAGEM DE FIBRINOGÊNIO

Para a Dosagem de Fibrinogênio, foi utilizado o método de CLAUSS (Fibriquik®), que consiste em medir o tempo de coagulação do plasma em presença de trombina concentrada (Organon Teknika, 1999).

Quando há adição de trombina à amostra de plasma, o fibrinogênio é convertido enzimaticamente em fibrina. A fibrina, por sua vez, por polimerização forma uma rede de fibrina. O fator XIII, ativado pela trombina, catalisa a formação de ligações cruzadas estabilizadoras para produzir um coágulo visível. O tempo decorrido desde a adição de trombina até a formação do coágulo é inversamente proporcional ao nível de fibrinogênio (Organon Teknika, 1999).

3.4.4. CONTAGEM DE PLAQUETAS

As plaquetas tem funções na homeostase, manutenção da integridade vascular, e no processo de coagulação do sangue. O teste foi realizado em aparelho hematológico automatizado (Colter® T890) no Laboratório de Hematologia do Hemoce.

3.4.5. DETERMINAÇÃO DO FATOR XIII (FXIII)

Prova de solubilidade em uréia 5M após 24 horas de incubação à 37°C ou ácido monocloroacético 1%.

A ação da trombina sobre o fibrinogênio leva à formação de monômeros de fibrina, que se polimerizam gerando a rede de fibrina. Após a polimerização ocorre estabilização por ação do fator XIII, na presença de íons

cálcio. Na ausência do fator XIII o polímero de fibrina se mantém apenas por ligações covalentes e ao passar de um meio hidrofílico se dissocia, tornando-se fibrina solúvel.

O estudo do FXIII é baseado nas características da solubilidade da fibrina. O método tem baixa sensibilidade. Pacientes com níveis do fator XIII de aproximadamente 5% apresentam resultados normais. Porém, a presença de manifestações clínicas é observada somente quando a atividade do fator XIII é inferior a 3%. Havendo deficiência do fator XIII, o coágulo dissolve-se ao cabo de 3 a 4 horas na uréia (Miller, 1999).

3.4.6. PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRINA (PDF)

O teste para determinação de PDF (Fibrinosticon - Organon Teknika) é uma prova de aglutinação imunológica com látex em que se utilizam partículas de látex recobertas com um anticorpo monoclonal específico para o domínio do D-dímero entrecruzando a fibrina. São detectados níveis elevados de derivados de fibrina entrecruzados que contém o domínio de D-dímero (> 500 ng/ml) em vários estados de coagulação ativados, incluindo os estados associados com a formação contínua e latente de trombina, e com o começo da fibrinólise reativa (Organon Teknika, 1990).

3.5. FUNÇÃO HEPÁTICA

Tem-se mostrado de grande valor clínico a dosagem de diversas enzimas no soro para fins de avaliação do grau de disfunção hepatocelular no decurso de doenças hepáticas. Baseia-se esse tipo de exame no conceito de que o achado no soro de teores anormalmente elevados de enzimas intracelulares significa existir alteração funcional ou orgânica das células que as contém, o que permite fuga das enzimas e sua passagem para o meio circulante. A lesão mínima capaz de permitir a saída de enzimas do interior das células é a alteração da permeabilidade da membrana celular (Miller, 1999). Como marcadores da

função hepática utilizamos as enzimas alanina amino transferase e gama glutamil transferase.

3.5.1. ALANINA AMINO TRANSFERASE (ALT)

A principal aplicação da determinação dessa enzima sérica é no diagnóstico da doença hepatocelular. Encontrada no fígado, embora a quantidade significativa possam ser encontradas nos rins e coração; é uma enzima não mitocondrial. O exame foi realizado em aparelho automatizado (XT - Bayer) no Laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário Walter Cantídio/UFC.

3.5.2. GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE (γ -GT)

Esta enzima está presente na membrana celular nas frações microssômicas e pode estar envolvida no transporte de aminoácidos através da membrana celular catalizando o transporte de um grupo glutamil da glutathione para um aminoácido livre. O principal valor clínico da determinação da γ -GT é no estudo da doença hepatocelular. Como a γ -GT é uma enzima microssômica, os seus níveis teciduais aumentam em resposta a indução enzimática microssômica, o que explica os seus níveis séricos elevados em alcoólatras crônicos e em pacientes fazendo uso de drogas sabidamente indutoras do sistema enzimático microssômico.

O exame foi realizado em aparelho automático (XT - Bayer), no Laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário Walter Cantídio.

3.6. CULTURA DO LAVADO PERITONIAL

Logo após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e coletado o material para realização da cultura microbiológica. Foi injetado 5 ml de salina estéril na cavidade peritoneal, e, em seguida retirado 0,5 ml do lavado e colocado em tubos contendo meio de cultura

estéril (BHI) para o possível crescimento das bactérias; vinte quatro horas após, foi feito o semeio em placas para cultura de enterobactérias em meio MacConkey.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EPM). Para a comparação dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA e teste de Tukey-Kramer). A significância foi aceita ao nível de $p < 0,001$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA INDOMETACINA, 1,8 CINEOL E BETAMETASONA SOBRE O TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

O tratamento com Indometacina (5 mg/Kg, v.o., 4d), Indometacina + Cineol (5 mg/Kg + 400 mg/Kg, v.o., 4d) e Indometacina + Betametasona (5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg, v.o., 4d), não alterou os testes de avaliação da coagulação – TP e TTPA – em relação ao grupo controle (Tabela 1).

4.2. EFEITO DA INDOMETACINA, 1,8 CINEOL E BETAMETASONA SOBRE OS NÍVEIS DE FIBRINO GÊNIO

Os animais tratados com Indometacina (5 mg/Kg, v.o., 4d), demonstraram um aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis de Fibrinogênio em relação ao grupo controle.

O tratamento com 1,8 cineol ou betametasona reverteu significativamente este aumento (1,8 cineol - $293,42 \pm 33,6$, Betametasona $279,21 \pm 30,7$) (Figura 2).

A figura 3a mostra o intestino dos animais tratados com Indometacina, no qual foi evidenciado a presença de uma malha de fibrina cobrindo o intestino; observou-se também algumas lesões macroscópicas (Figura 4). Nos animais tratados com 1,8 Cineol e Betametasona não foi observado a presença de fibrina nem de lesões intestinais (Figura 3c, 3d).

TABELA 1: Efeito da Indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona sobre o Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

TRATAMENTO	TP	TTPA
Controle	8,75 ± 0,17	10,35 ± 1,19 (8)
Indometacina 5 mg/Kg	8,60 ± 0,46	13,39 ± 1,22 (13)
Indometacina + Cineol 5 mg/Kg + 400 mg/Kg	8,25 ± 0,11	13,72 ± 0,23 (7)
Indometacina + Betametasona 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg	9,3 ± 0,26	13,24 ± 0,86 (7)

Os animais foram tratados durante quatro dias e, no último dia foi feita a coleta do sangue para realização das dosagens. Os valores estão expressos com a média ± EPM. O número entre parênteses representam o número de animais por grupo.

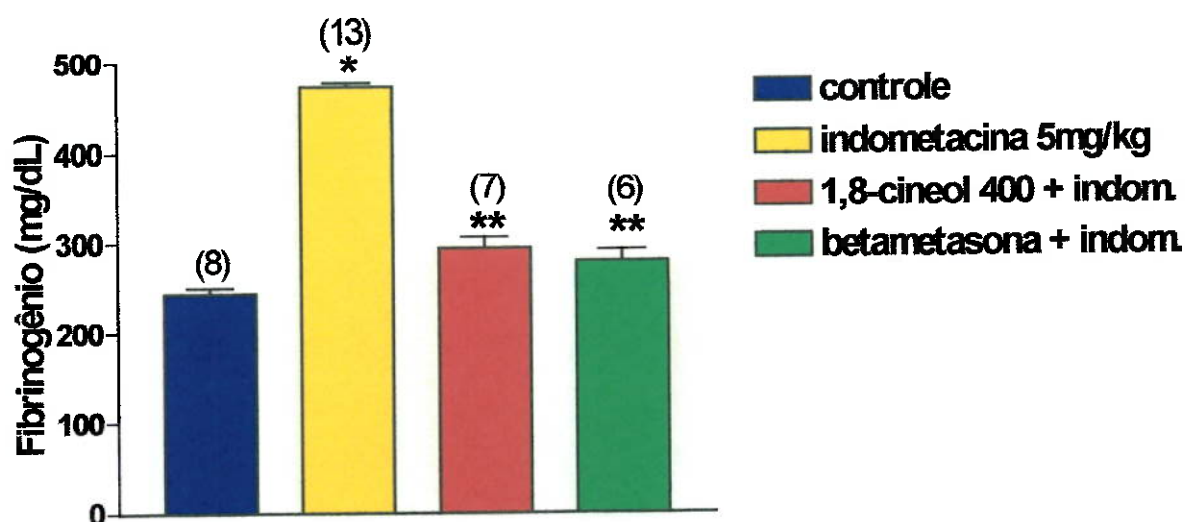


Figura 2: Efeito da Indometacina sobre os níveis de fibrinogênio plasmático.

Os animais tratados com Indometacina (5mg/Kg) apresentaram um aumento significativo ($p > 0,001$) nos níveis de fibrinogênio plasmático em relação ao grupo controle. Este aumento foi revertido nos animais tratados com 1,8 Cineol (400 mg/Kg) e a Betametasona (1,5 mg/kg) . (*) VS Grupo controle; (**) VS Indometacina; ANOVA e teste de Turkey-Kramer.

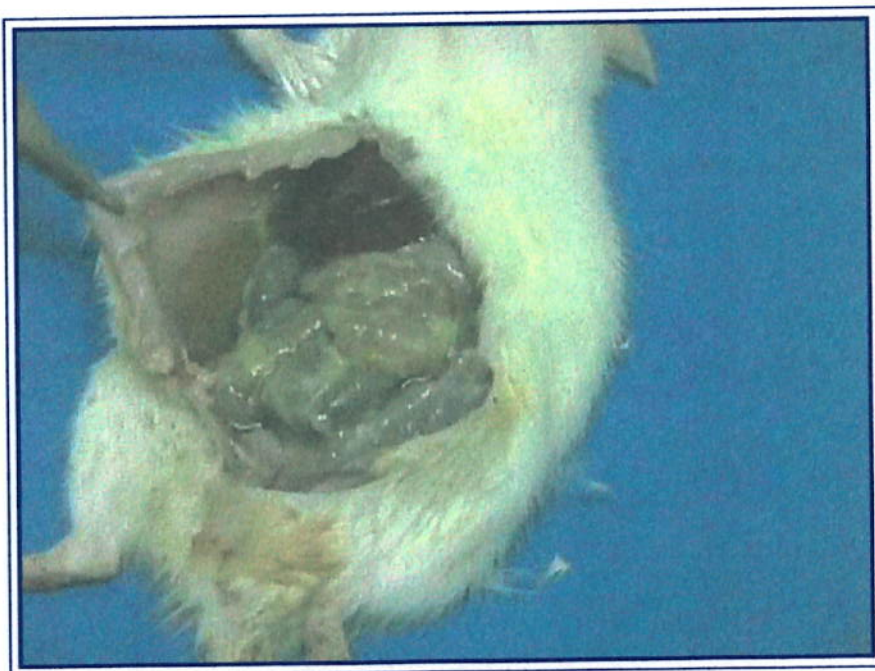


Figura 3: Animal pertencente ao grupo controle (3a); Animal tratado com Indometacina – presença de uma malha de fibrina (3b).

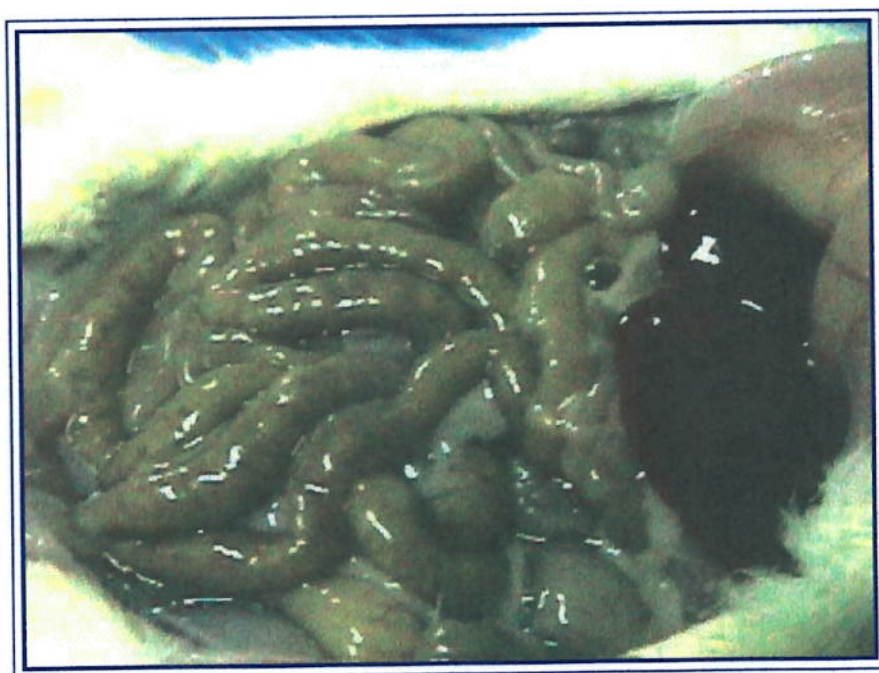


Figura 3: Animais tratados com 1,8 Cineol (3c) e Betametasona (3d) não apresentaram malhas de fibrina nem lesões intestinais.

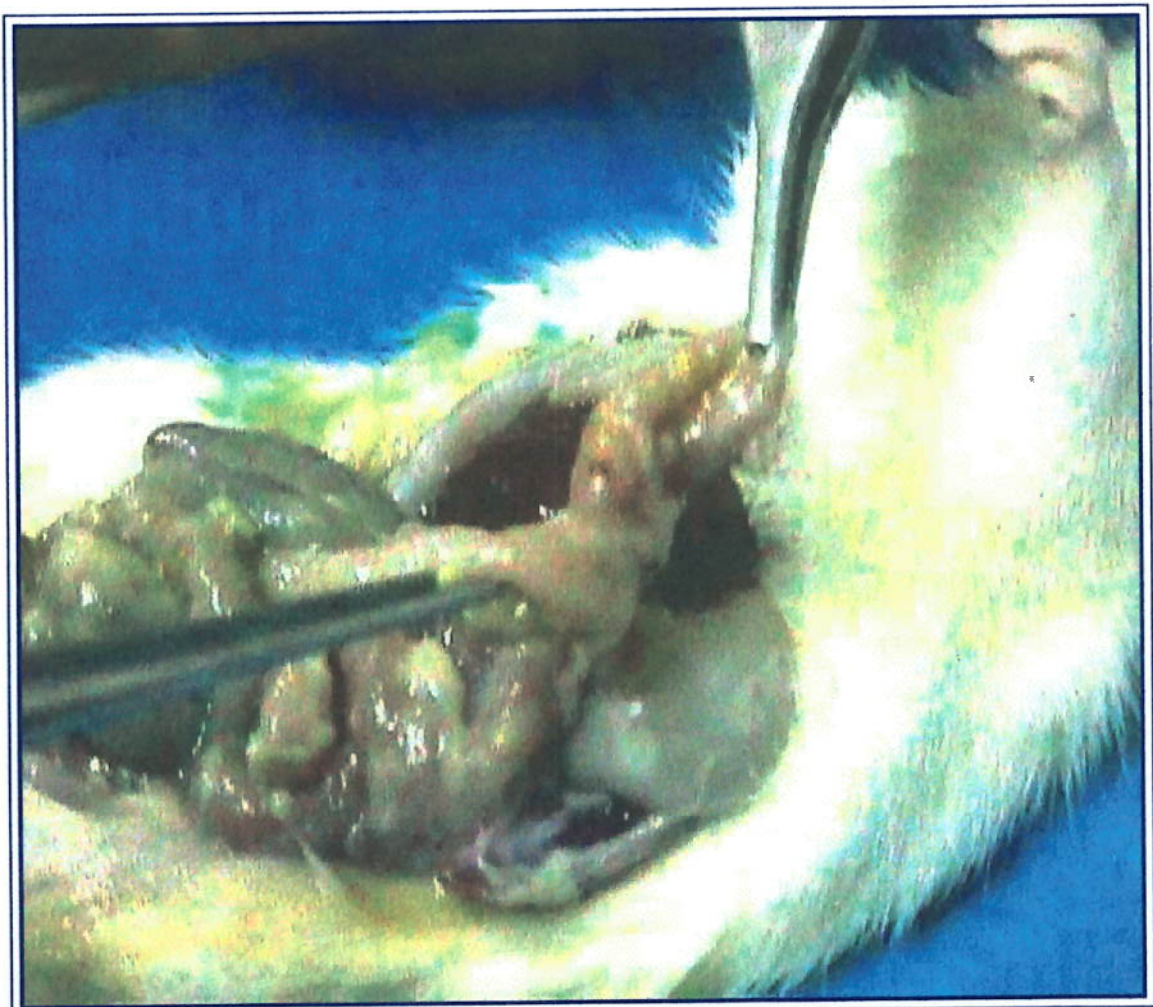


Figura 4: Animal tratado com Indometacina apresentando lesão intestinal

4.3. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DO LAVADO PERITONEAL NOS ANIMAIS TRATADOS COM INDOMETACINA, 1,8 CINEOL E BETAMETASONA

Os animais tratados com Indometacina apresentaram positividade em 75% das culturas realizadas para enterobactérias, mostrando assim, a presença de bactérias do trato gastrointestinal na cavidade peritoneal, provavelmente devida a uma perfuração intestinal induzida pela droga. Nos animais do grupo controle e tratados com Cineol e Betametasona a positividade foi de 20%, 0% e 20% respectivamente (Tabela 2).

4.4. EFEITO DA INDOMETACINA, 1,8 CINEOL E BETAMETASONA SOBRE O NÚMERO DE PLAQUETAS

A tabela 3 mostra que a Indometacina (5 mg/Kg, v.o., 4d), Indometacina + Cineol (5 mg/Kg + 400 mg/Kg, v.o., 4d) e Indometacina + Betametasona (5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg, v.o., 4d), não alteram o número de plaquetas, isto não quer dizer que o processo de agregação plaquetária permaneça intacto.

4.5. EFEITO DA INDOMETACINA, 1,8 CINEOL E BETAMETASONA SOBRE OS NÍVEIS DE FATOR XIII E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRINA

Na avaliação do FXIII e PDF dos animais em estudo, não obtivemos nenhum resultado alterado como mostra a tabela 4. Com o resultado normal do PDF afasta-se a possibilidade de alteração no sistema fibrinolítico.

Tabela 2: Estudo microbiológico do lavado peritoneal nos animais tratados com Indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona

TRATAMENTO	CULTURA POSITIVA
Controle	1/5 (20%)
Indometacina 5 mg/Kg	3/4 (75%)
Indometacina + Cineol 5 mg/Kg + 400 mg/Kg	0/4 (0%)
Indometacina + Betametasona 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg	1/5 (20%)

Após a coleta sangüínea, no último dia de tratamento, os animais do grupo controle e tratados foram submetidos a lavagem peritoneal, para a realização da cultura. Os resultados estão expressos em cultura positiva/animais por grupo

TABELA 3: Efeito da indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona sobre o número de plaquetas.

TRATAMENTO	PLAQUETAS
Controle	782,750 ± 61,974 (4)
Indometacina 5 mg/Kg	616,000 ± 82,809 (3)
Indometacina + Cineol 5 mg/Kg + 400 mg/Kg	855,000 ± 51,507 (3)
Indometacina + Betametasona 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg	814,750 ± 27,696 (4)

Os valores estão expressos com a média ± EPM. O número entre parênteses representam o número de animais por grupo

Tabela 4: Efeito da Indometacina, Cineol e Betametasona sobre os níveis de Fator XIII e Produtos de Degradação de Fibrina

TRATAMENTO	F XIII	PDF
Controle	> 50%	Negativo (6)
Indometacina 5 mg/Kg	> 50%	Negativo (10)
Indometacina + Cineol 5 mg/Kg + 400 mg/Kg	> 50%	Negativo (8)
Indometacina + Betametasona 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg	> 50%	Negativo (7)

A análise do FXIII e PDF é de natureza qualitativa. Os números entre parênteses representa o numero de animais por grupo.

4.6. Efeito da Indometacina, 1,8 Cineol e Betametasona sobre os níveis da alanina amino transferase e gama glutamil transferase.

A tabela 5 demonstra que os animais tratados com Indometacina (5 mg/Kg, v.o., 4d), Indometacina + Cineol (5 mg/Kg + 400 mg/Kg, v.o., 4d) e Indometacina + Betametasona (5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg, v.o., 4d), apresentaram resultados normais de ALT e γ -GT, demonstrando que não houve nenhuma alteração a nível hepático.

Tabela 5: Efeito da Indometacina, Cineol e Betametasona sobre os níveis da Alanina Amino Transferase e Gama Glutamil Transferase

TRATAMENTO	ALT	γ -GT
Controle	$50 \pm 3,89$	$2,75 \pm 0,25$ (4)
Indometacina 5 mg/Kg	$28 \pm 4,16$	$2,33 \pm 1,85$ (3)
Indometacina + Cineol 5 mg/Kg + 400 mg/Kg	$51,6 \pm 8,41$	$2,33 \pm 0,33$ (3)
Indometacina + Betametasona 5 mg/Kg + 1,5 mg/Kg	$42,5 \pm 3,37$	$2,25 \pm 0,85$ (4)

Os valores estão expressos com a média \pm EPM. O número entre parênteses representam o número de animais por grupo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A administração crônica de certos antiinflamatórios não estereoidais (AINEs), tais como a indometacina em seres humanos produz inflamação no trato gastrointestinal. Aproximadamente 70% dos pacientes que utilizam doses terapêuticas de AINEs por mais de seis meses apresentam um aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, ulceração e sangramento gastrointestinal em humanos e em animais (Lovgren e Allander, 1964; Brondie et al., 1970; Bjarnason et al., 1987). As lesões intestinais induzidas pela indometacina em ratos ocorrem no jejuno e íleo, estas lesões consistem inicialmente de nódulos brancos e segmentos hemorrágicos palpáveis da superfície serosa. Subsequentemente ocorrem adesão massiva das vísceras abdominais em resposta à perfuração intestinal culminando em morte por peritonite e septicemia (Brodie et al., 1970; Robert, 1975).

De acordo com os achados de outros autores, nosso trabalho mostrou que o tratamento durante 4 dias com indometacina (5 mg/kg), por via oral, acarretou lesões hemorrágicas a nível duodenal em alguns animais, adesão entre as alças intestinais com formação de uma capa de fibrina cobrindo o intestino, além disso, observamos a presença de um líquido fétido e escuro no peritônio, com a presença de grande quantidade de enterobactérias, confirmando uma perfuração intestinal. Também foi observado diarreia e a aparência moribunda dos animais. A inibição da cicloxigenase (COX) o que leva à depleção das prostaglandinas (PGs) endógenas, pode ser o maior fator na patogênese destas lesões, pois a suplementação com PGs previne a ocorrência de danos no trato gastrointestinal em resposta ao tratamento com indometacina (Redfern et al., 1987). Entretanto existe uma controvérsia no envolvimento das PGs nesta patogênese.

Vários estudos mostram o papel patogênico da flora bacteriana na formação das lesões intestinais induzidas pela indometacina, tendo sido demonstrado que animais livre de germes ou tratados com antibióticos não desenvolviam lesões (Robert e Asano, 1977; Weissenborn et al., 1985). Por outro

lado, Whittle e cols. (1995) demonstraram que a nitrogênio sintase induzida (iNOS) e o óxido nítrico (NO) eram importantes na ocorrência de danos na microvasculatura em jejuno de ratos tratados com indometacina. Já está demonstrado um aumento na concentração de enterobactérias após o tratamento com indometacina (Yamada et al., 1993) e o tratamento com ampicilina ou metronidazol inibem a inflamação intestinal induzida pela droga. Konaka e cols. (1999) demonstraram que a ampicilina por inibir a invasão da mucosa pelas enterobactérias, previne a formação da lesão intestinal e também a indução da iNOS pela indometacina. Boughton-Smith e cols. (1993) mostraram que a endotoxina bacteriana produzida pela *E. coli*, a bactéria predominante na flora intestinal, aumenta a permeabilidade intestinal através do aumento da expressão da iNOS. Estes resultados sugerem que a invasão da enterobactérias na mucosa seja o primeiro evento responsável pelas lesões intestinais induzidas pela indometacina, liberando assim endotoxina resultando na superprodução de NO através da indução da expressão de iNOS. O mecanismo pelo qual a indometacina causa a invasão bacteriana é incerto. A toxicidade tópica pode ser um fator importante pois este agente é excretado na bile, danifica a barreira físico-química e conseqüentemente deixa a mucosa mais susceptível à injúria (Lugea et al., 1997; Whittle, 1981). Além disso a indometacina reduz a secreção de muco por inibir a produção da PGE₂, o que facilitaria a invasão bacteriana (Robert e Asano, 1977; Kato et al., 1999).

Trabalhos demonstram que o celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2 não produz danos significativos na mucosa do intestino delgado quando comparado com a indometacina, um inibidor da COX não seletivo, sendo esta seletividade demonstrada pela insignificante diminuição nos níveis de PGE, 3 horas após a dosagem, em contraste com a indometacina que causou uma redução de 90% nos níveis desta prostaglandina, além disso celecoxib não demonstra um toxicidade tópica (Tibble et al., 2000). Os AINEs mais comumente usados são ácidos e isto combinado à lipossolubilidade pode ser responsável pela toxicidade tópica, demonstrada pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, o que leva ao aumento da permeabilidade intestinal e inflamação (Somasundaram et al., 1997). Assim, estes dois efeitos, redução dos

níveis de PGE e toxicidade tóxica podem contribuir para os efeitos lesivos da indometacina à mucosa intestinal.

Nosso trabalho mostrou que a lesão intestinal induzida pela indometacina foi revertida pelo tratamento com o terpenóide 1,8- cineol, presente nos óleos essenciais de plantas do gênero *Psidium* e *Eucalypto*. Trabalhos evidenciaram um efeito antibacteriano do 1,8-cineol (Pattnaik et al., 1997), bem como, um efeito antiinflamatório e analgésico (Santos e Rao, 2000). Além disso já foi demonstrado um efeito inibitório do cineol na produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) e interleucina-1 β (IL-1 β) de monócitos humanos in vitro (Juergens et al., 1998) e por D-galactosamina/LPS em camundongos (Santos et al, in press). Bertrand e cols. (1998) demonstraram que produção de TNF- α estava ligada a toxicidade pela indometacina no intestino delgado, especialmente no estágios iniciais do processo ulcerogênico. Eles demonstraram que o aumento na produção de TNF- α precedia a indução da iNOS e a ativação neutrofílica, como também o desenvolvimento das lesões intestinais induzidas pela administração da indometacina. E outros autores reforçaram estes achados ao demonstrarem que o TNF- α ativa neutrófilos e induz a expressão de iNOS (Santucci et al., 1995). É possível que a citoproteção induzida pelo 1,8-cineol tenha decorrido dos seus efeito antimicrobiano, juntamente com o efeito inibidor na produção de TNF- α . Também evidenciamos que a betametasona protege a mucosa gastrointestinal contra os danos induzidos pela indometacina, trabalhos têm demonstrado que os corticosteróides inibem a síntese de TNF- α este sendo provavelmente, o mecanismo principal pelo qual os corticosteróides exercem este efeito (Han et al., 1992; Santucci et al., 1995).

A indometacina sofre metabolização hepática, sendo convertida em metabólitos ativos e alguns autores relatam alguns casos de hepatite e icterícia, bem como alguns danos hematopoiéticos como neutropenia, trombocitopenia e raramente anemia aplástica (Hardman et al., 1996). Assim resolvemos investigar os efeitos da indometacina no fígado e sobre as células sanguíneas. O tratamento durante 4 dias com indometacina sozinha ou associada com 1,8-cineol ou betametasona não ocasionou dano hepático ou hematológicos, como evidenciado pelos níveis normais das enzimas ALT e γ -GT, do hemograma e das plaquetas. A

indometacina provoca um desacoplamento da fosforilação oxidativa celular e inibição da agregação plaquetária. O fato de impedir a formação do tromboxano A₂, explica a tendência da indometacina em prolongar o tempo de sangramento. Mas neste trabalho não evidenciamos alterações na cascata da coagulação ou da fibrinólise pelo tratamento com indometacina, demonstrado pela normalidade no tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, nos níveis fator XIII e produtos de degradação de fibrina.

Já está bem estabelecido que diferentes tipos de injúria tecidual causa um aumento na síntese do fibrinogênio plasmático (Atencio et al., 1969; Reeve e Franks, 1974). Vários hormônios desempenham um papel neste aumento, que é produzido por não somente um fator, mas por um grupo de fatores que trabalham juntos. Pouco é conhecido sobre o sinal que nos tecidos danificados, produz um aumento no fibrinogênio plasmático, vários estudos mostram que a remoção da medula adrenal de ratos laparotomizados diminui parcialmente o fibrinogênio plasmático, mostrando o papel da epinefrina (Palma et al., 1981). Isto pode nos levar a pensar que o sinal produtor de um aumento do fibrinogênio pode ser através do sistema simpático e parcialmente através do fluxo para o fígado. Além disso, as prostaglandinas mediadoras da resposta inflamatória, podem sensibilizar as terminações nervosas tornando-as mais sensíveis à estimulação mecânica e térmica, podendo levar à estimulação da medula adrenal (Ferreira e Vane, 1974).

O nosso trabalho mostrou que o tratamento com indometacina, leva a um grande aumento nos níveis de fibrinogênio. Gavotto e cols. (1985) mostraram efeito contrário, com a indometacina levando a uma diminuição no fibrinogênio em animais com injúria tecidual. É provável que a diferença na metodologia possa explicar a diferença de resultado, no nosso trabalho, a retirada no sangue dos animais foi feita no último dia do tratamento e no trabalho de Gavotto a retirada do sangue foi feita após 72 horas. Nós explicamos este aumento à lesão tecidual induzida pela indometacina, levando a um quadro inflamatório, com aumento da permeabilidade intestinal, TNF- α e prostaglandinas, principalmente, PGE₁. Vários trabalhos demonstram um aumento no fibrinogênio induzido pela PGE₁ (Fradl e Reeve, 1973). PGE₁ pode estimular a síntese de fibrinogênio agindo em receptores à distância do fígado, ou diretamente no fígado, já tendo sido

encontrados receptores para a PGE1 no fígado (Smigel e Fleischer, 1974). O aumento nos níveis de fibrinogênio pela indometacina foi revertido pelo 1,8-cineol e por dexametasona, é possível que a inibição do TNF- α por estas drogas possa explicar esta ação.

Concluimos que a dosagem dos níveis de fibrinogênio pode ser usado como um marcador útil na avaliação de agentes que causam lesões no TGI, que se não tratadas podem evoluir para um quadro de choque séptico. Além de servir para monitorar a evolução do paciente. Além disso concluimos que o 1,8-cineol é um excelente agente natural, que poderia vir a ser utilizado clinicamente para minimizar as lesões inflamatórias do trato gastrointestinal induzidas pelo tratamento com indometacina, em pacientes com doenças inflamatórias crônicas.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Os animais tratados com indometacina apresentaram lesão intestinal, observada macroscopicamente pela presença de pontos hemorrágicos ao longo do intestino delgado, e pela cultura positiva para enterobactérias do lavado peritoneal.

Os animais tratados com indometacina, 1,8 cineol e betametasona não apresentaram TP e TTPA alongados, i. e., não houve alteração na via intrínseca e extrínseca da coagulação.

Os níveis de fibrinogênio apresentaram claramente um aumento significativo nos animais tratados com indometacina; os mesmos apresentaram malha de fibrina recobrindo todo o intestino.

O 1,8 Cineol e betametasona bloquearam significativamente o aumento do fibrinogênio induzido pela indometacina, bem como a formação da malha de fibrina.

O número de plaquetas não foi alterado com o uso de indometacina, 1,8 cineol e betametasona.

Os animais tratados com indometacina, 1,8 cineol e betametasona não apresentaram alteração nos testes PDF e FXIII, analisados por métodos qualitativos.

Os animais tratados com indometacina, 1,8 cineol e betametasona não apresentaram nenhuma alteração a nível hepático, demonstrada pelos níveis normais das enzimas ALT e γ -GT.

SUMMARY

7. SUMMARY

Indometacina, derived indol metilado, one of the most potent inibidores of the cicloxygenase in vitro, is an antiinflamatório no-esteróide effective clinicamente, but with high incidence of collateral effects. Used to treat rheumatic arthritis and similar diseases, Indometacina induces inflammation in the mucous intestinal and ulcers in patient. In this work the effect of this drug was analyzed on the intestinal epithelium and the increase in the levels of fibrinogênio plasmático induced by the same. Mice were treated with Indometacina (5 mg/Kg), 1,8 Cineol (400 mg/Kg), an oxide terpenóico present present in a lot of plants of essential oils, and Betametasona (1,5 mg/Kg), orally., in a period of 4 days. The animals were submitted to collect of blood in the fourth day of treatment, through the puncture of the plexo orbital of the eye, after they were anesthetized with ether. The blood was placed in tubes contends citrato of sodium 3,8%, is tended attention of observing the presence of hemólise e/ou fibrin mesh for consequent elimination. The studied parameters were: time of protrombina (TP), time of activated partial tromboplastina (TTPA), fibrinogênio, plaquetas contagem, factor XIII, products of degradation of the fibrina (PDF), culture of the washed peritoneal and hepatic evaluation (ALT, g-GT). The results of TP, TTPA, plaquetas contagem, FXIII and PDF were normal in relation to the group it controls. In the treated animals with Indometacina ($473,07 \pm 15,84$) we observed a significant increase ($p < 0,001$) in the fibrinogênio levels and this increase were reverted by the treatment with 1,8 Cineol ($293,42 \pm 33,6$) and Betametasona ($279,21 \pm 30,7$). The animals treated with Indometacina presented positivity in 75% of the cultures for enterobacterias, it shows the presence of bacterias of the gastrointestinal tract in the cavity peritoneal, probably due to an intestinal perforation induced by the drug. The studied drugs didn't demonstrate effect hepatotóxico as demonstrated by the normal levels of the enzymes ALT and g-GT. We concluded that 1,8 cineol apresntou an excellent enteroprotector effect, could be useful as helping in the treatment of patients' with chronic inflammatory disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ACHE. **Identificação do produto.** Indocid. Disponível na internet via: <<http://www.ache.com.br>>. Acesso em: 27 de outubro de 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6023.** Brasília, 2000. Disponível na Internet via: <<http://www.abnt.com.br>>. Acesso em 15 de dezembro de 2000.

ATENCIO, A C.; CHAO, P. Y.; REEVE, E. B. Fibrinogen response to corticotropin preparations in rabbits. **Am. J. Physiol.**, v. 216, p. 773-780, 1969.

BERTRAND, V.; GUIMBAUD, R.; TULLIEZ, M. et al. Increase in tumor necrosis factor- α production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 1385-1394, 1998.

BEUTLLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J. **Williams hematology.** 5th ed. Washington: Library of Congress, 1995. p. 1253-1257, 1439-1449.

BJARNASON, I.; ZANELLI, G.; SMITH, T.; PROUSE, P.; WILLIAMS, P.; SMETHURST, P.; DELACEY, G.; GUMPEL, M. J.; LEVI, A.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. **Gastroenterology**, v. 93, p. 480-489, 1987.

BRODY, T. M. et al. **Farmacologia humana da molecular à clínica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 344-353.

BRONDIE, D. A.; COOK, P. G.; BAUER, B. J.; DAGLE, G. E. Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 17, p. 615-624, 1970.

BROUGHTON-SMITH, N. K.; EVANS, S. M.; LASZLO, F. et al. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1189-1195, 1993.

CÂMARA, F. M. Coagulação: aspectos laboratoriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 25, 1998, Goiânia. **Anais...**

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia**. Belo Horizonte: Coopmed, 1999. p. 185-186.

COOK, J. A.; WISE, W. C.; HALUSHKA, P. V. Elevated thromboxane levels in the rat during endotoxic shock. **J. Clin. Invest.**, v. 65, p. 227-230, 1979.

COTRAN, R. S.; KUMAN, V.; ROBINS, S. L.; SCHOEN, Frederick. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 57-66, 105-108.

CRAIG, C. **Farmacologia moderna**. São Paulo: Roca, 1986. p. 316-27.

DADE BEHRING MARBURG. **Tromborel**. Marburg, 1999

EVANS, S. M.; LÁSZLÓ, F.; WHITTLE, B. J. R. Site-specific lesion formation, inflammation and inducible nitric oxide synthase expression by indomethacin in the rat intestine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 388, n. 3, p. 281-285, 2000.

FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. New aspects of the mode of action of nonsteroid antiinflammatory drugs. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 14, p. 57-73, 1974.

FISHER, A. A.; KALIUZHNAIA, E. N.; SAKHA, S. K. Effect of indomethacin on basic parameters of gastric secretion, aggregative activity of blood platelets and fibrinolysis. **Ter. Arkh.**, v. 59, n. 2, p. 34-39, 1987.

FLEETHER, M. S.; WESTWICK, J.; KAKKAR, V. V. Endotoxin, prostaglandins and renal fibrin deposition in obstructive jaundice. **Br. J. Surg**, v. 69, n. 10, p. 625-629, 1982.

FRADL, D.; REEVE, E. B. plasma fibrinogen response to prostaglandin infusions. **Fed. Proc.**, v. 32, n. 265, 1973.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica fundamentos da terapêutica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 114-119, 187-193.

FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE. **Curso de capacitação para profissionais de laboratório de hemostasia**. São Paulo, 2000.

GAVOTTO, A. C.; PALMA, J. A.; VILLAGRA, S. B. Effects of indometacina on plasma fibrinogen levels in rats with tissue injury. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 274, p. 230-237, 1985.

GRUPO CLATH. **Manual de hemostasia y trombosis**. 2. ed. Argentina, 1990.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R.; Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v. 89, p. 39-46, 1997.

HAN, J.; THOMPSON, P.; BEUTLER, B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 391-394, 1990.

HANSTEN, P. D. **Associação de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1989.

HARDAMAN J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's The pharmaceutical basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 450-463, 634, 1082-1101.

HENRY, J. B. **Diagnósticos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 247.

JAGER, W.; NASEL, B.; NASEL, C. et al. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in humans during inhalation. **Chem. Senses**, v. 21, n. 4, p. 477-480, 1996.

JANDL, J. H. **Blood textbook of hematology**. 2. ed. Washington: Library of Congress, 1996. p. 1253.

JONGE, E. et al. Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation. activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1124-1129, 2000.

JUERGENS, U. R.; STOBBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **Eur. J. Med. Res.**, v. 17, p. 508-510, 1998.

JUERGENS, U. R.; STOBBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineol) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, n. 9, p. 407-412, 1998.

KATO, S.; KONAKA, A.; TANAKA, A.; NISHIJIMA, M.; TAKEUCHI, K. nitric oxide, superoxide radicals and mast cells in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 50, p. 25-38, 1999.

KATSUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 408-416.

KONAKA, A., KATO, S., TANAKA, A. et al. Roles of enterobactéria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indometacin-induced small intestinal lesions in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 40, p. 517-24, 1999.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 198, 688-689.

LEE, G. R et al. **Wintrobe hematologia clínica**. São Paulo: Manole, 1998. v. 2.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1999. p. 184-200.

LOVGREN T.; ALLANDER, E. Side-effects of indomethacin. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 118, 1964.

LUGEA, A.; ANTOLIN, M.; GUAMER, F.; MALAGELADA, J. R. deranged hydrophobic barrier of the rat gastroduodenal mucosa after parenteral nonteroidal antiinflammatory drugs. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1931-1939, 1997.

MAZZA, J. J. **Manual de hematología clínica**. Barcelona: Salvat, 1990. p. 336.

MELO, N. B. C.; ROSENFELD, L. G. M. **Fibrinólise**. São Paulo: Centro de Hematologia, 1999.

MILLER, O. e cols. **Laboratório para o clínico**. 8. Ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

ORGANON TEKNIKA. **Fibrinosticon**. BOXTEL, 1990. 61p.

ORGANON TEKNIKA. **Fibriquik**. Durham, 1999.

ORGANON TEKNIKA. **Platelin L S**. Durham, 1998.

PALMA, J. A.; ENDERS, J.; OLIVA, P. effects of epinephrine on plasma fibrinogen levels in rats submitted to tissue injury. **Experientia**, v. 37, p. 780-781, 1981.

RANG, H. P, DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997:. p. 169-192, 194-208.

REDFERN, J. S.; BLAIR, A. J.; LEE, E.; FELDMAN, M. Gastrointestinal ulcer formation in rabbits immunized with prostaglandin E₂. **Gastroenterology**, v. 93, p. 744-752, 1987.

REEVE, E. B.; FRANKS, J. J. Fibrinogen synthesis, distribution and degradation in health and disease. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 1, p. 129-183, 1974.

ROBERT, A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. **Gastroenterology**, v. 69, p. 1045-1047, 1975.

ROBERT, A.; ASANO, T. Resistance of germ-free rats to indomethacin-induced intestinal lesions. **Prostaglandins**, v. 14, p. 333-341, 1977.

SAMPOL, J.; ARNOUX, D.; BOUTIÈRE, B. **Physiologie du systeme fibrinolytique**. Manuel d'hémostase. Amsterdam: Elsevier, 1995. cap. 3

SANTOS, F. A. **Estudo farmacológico de 1,8 cineol, um óxido terpênico presente em óleos essenciais de plantas**. Fortaleza, 1998. Dissertação (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, 1999.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in amny plant essential oils. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; MATTEO, F.M.; MORELLI, A. Role of tumor necrosis factor α release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats. **Gastroenterology**, v. 108, p. 393-401, 1995.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 507-17, 398-399.

SMIGEL, M.; FLEISCHER, S. Characterization and localization of prostaglandin E1 receptors in rat liver membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 332, p. 358-373, 1974.

SOMASUNDARAM, S.; RAFI, S.; HAYLLAR, J.; SIGTHORSON, G.; JACOB, M.; PRICE, A. B.; et al. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the topical phase of NSAID induced injury to the rat intestine. **Gut**, v. 41, p. 344-53, 1997.

SORIANO ROSAS, J. CARRERAS GONZALEZ, E.; LAVENANT BORJA, I. et al. Ileíte crônica por antiinflamatórios no esteroideos en un paciente con espondilitis anquilosante. **Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.**, v. 61, n. 1, p. 47-50, 1998.

TIBBLE, J. A.; SIGTHORSSON, G.; FOSTER, R.; BJARNASON, I. Comparison of the Intestinal Toxicity of Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, and Indomethacin in the experimental rat. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 35, p. 802-807, 2000.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

WALLACE, J. L.; MECKNIGHT, W.; REUTER, B. K.; VERGNOLLE, N. NSAID: Induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, p. 706-714, 2000.

WALLACH, J. **Interpretação de exames de laboratório**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p. 33, 480.

WEISSENBERN, U.; MAEDGE, S.; BUETTNER, D.; SEWING, K. F. Indometacin-increased gastrointestinal lesions in relation to tissue concentration, food intake and arterial invasion in the rat. **Pharmacology**, v. 30, p. 32-39, 1985.

WHITTLE, B. J. R. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in rat. **Gastroenterology**, v. 80, p. 94-98, 1981.

WHITTLE, B. J. R.; LASZLO, F.; EVANS, S. M.; MONCADA, S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 2286-2290, 1995.

YAMADA, T.; DEITCH, E.; SPECIAN, R. D. et al. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**, v. 17, p. 641-662, 1993.

ZANINE, A. C. **Farmacologia aplicada**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p. 437-469